



Universidad Autónoma de Madrid



**Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias**

**Caracterización estructural y  
funcional del complejo formado  
por DnaK y GrpE de *E. coli***

**Tesis Doctoral**

**María Ángeles Pérez Calvo  
Madrid, 2013**





Universidad Autónoma de Madrid



# **Universidad Autónoma de Madrid**

## **Departamento de Biología Molecular**

### **Facultad de Ciencias**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

**María Ángeles Pérez Calvo**

Universidad Autónoma de Madrid  
Noviembre de 2007

**Directores de Tesis:**

**Dr. José María Valpuesta**  
CNB-CSIC

**Dr. Óscar Llorca**  
CIB-CSIC





El trabajo recogido en esta memoria ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) bajo la dirección conjunta de los Drs. José María Valpuesta (CNB-CSIC) y Óscar Llorca del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) y en colaboración con el laboratorio del Dr. Arturo Muga Villate de la Unidad de Biofísica en la Universidad de País Vasco del campus de Lejona (UPV).



*A mi familia*



# Índice



<b>Índice</b>	<b>i</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>v</b>
<b>Summary</b>	<b>1</b>
<b>1.Introducción</b>	<b>5</b>
1.1 El plegamiento de las proteínas	7
1.2 El medio intracelular como escenario de plegamiento	8
1.3 Las chaperonas moleculares al rescate	9
1.4 Del ribosoma a proteína plegada: procariotas vs. eucariotas	13
1.5 Las Hsp70s como chaperonas	15
1.6 DnaK, la Hsp70 procariota	18
1.6.1 La estructura de DnaK	18
1.6.2 El ciclo funcional de DnaK	19
1.6.3 Sustratos del sistema DnaK	21
1.6.3.1 Agregados proteicos	21
1.6.3.2 Péptidos y proteínas desplegadas	21
1.6.3.3 Sustratos nativos	22
1.7 GrpE y demás factores de intercambio de nucleótidos	23
1.8 GrpE y su interacción con DnaK	26
<b>2. Objetivos</b>	<b>29</b>
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>33</b>
3.1 Purificación de proteínas	35
3.1.1 Purificación de DnaK	35
3.1.2 Purificación de DnaK <sub>R151A</sub>	36
3.1.3 Purificación del dominio de unión a nucleótido de DnaK (DnaK <sub>NBD</sub> )	36
3.1.4 Purificación de GrpE	36
3.1.5 Purificación de GrpE <sub>34-197</sub>	37
3.1.6 Purificación de GrpE <sub>69-197</sub>	37
3.2 Actividad ATPasa de DnaK	37
3.3 Purificación de ADP	38

<b>3.4 Ensayos de Interacción</b>	<b>38</b>
3.4.1 Ensayo de interacción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas	38
3.4.2 Purificación de los complejos DnaK/GrpE y DnaK <sub>NBD</sub> /GrpE por cromatografía de filtración en gel	39
3.4.3 Cinéticas de unión a sustrato	40
<b>3.5 Proteólisis parcial con papaína</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Microscopía electrónica</b>	<b>41</b>
3.6.1 Preparación de muestras	41
3.6.2 Adquisición de imágenes	41
3.6.3 Digitalización y procesamiento digital de imágenes	42
3.6.4 Clasificación bidimensional de partículas	42
3.6.5 Reconstrucción tridimensional de los complejos DnaK:GrpE	43
3.6.6 Ajuste de las estructuras atómicas al volumen tridimensional de los complejos DnaK:GrpE	44
<b>4.Resultados</b>	<b>45</b>
4.1 Purificación de proteínas	47
4.1.1 Purificación de DnaK, DnaK <sub>R151A</sub> y de DnaK <sub>NBD</sub>	47
4.1.2 Purificación de GrpE y sus diferentes variantes	47
4.2 Ensayo de interacción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas	48
4.3 Cinéticas de unión a sustrato	49
4.4 Experimentos de proteólisis parcial con papaína	51
4.5 Caracterización de la formación de complejos DnaK:GrpE por cromatografía de filtración en gel	56
4.6 Purificación del complejo DnaK:GrpE	56
4.7 Purificación del complejo DnaK <sub>NBD</sub> :GrpE	57
4.8 Reconstrucción tridimensional del complejo DnaK:GrpE por Microscopía Electrónica	58
4.9 Localización de cada uno de los dominios de DnaK y GrpE dentro del mapa de densidad electrónica	64



<b>4.10 Análisis estructural del extremo amino-terminal de GrpE</b>	<b>65</b>
<b>5.Discusión</b>	<b>67</b>
<b>5.1 Caracterización estructural de DnaK:GrpE</b>	<b>71</b>
5.10.1 Flexibilidad conformacional en el “tallo” de GrpE	74
5.10.2 Hipótesis de la función termosensora de GrpE	75
5.10.3 Aparición de una estructura alternativa del complejo DnaK:GrpE	76
<b>5.2 Caracterización funcional de DnaK y GrpE</b>	<b>79</b>
5.2.1 Análisis espectroscópicos de la interacción entre GrpE:DnaK y sustrato	80
5.2.2 Estudios de accesibilidad proteolítica del complejo DnaK:GrpE	81
<b>6.Conclusiones</b>	<b>85</b>
<b>7.Bibliografía</b>	<b>89</b>



# Abreviaturas

---

2D	bidimensional
3D	tridimensional
Å	Angstrom ( $10^{-10}$ metros)
ADP	Adenosín-5'-difosfato
ATP	Adenosín-5'-trifosfato
CTF	Función de transferencia de contraste
dNR	$\alpha$ -N,dansyl-NRLLLTG
DO	densidad óptica
DTT	Ditrioteitol
E64	trans-epoxysucinil-L-leucil-amido(4-guanidino) butano
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FSC	Correlación de los anillos de Fourier
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanosulfónico
HSPs, Hsps	Proteínas de choque térmico
IDPs	Proteínas intrínsecamente desordenadas
IDRs	Regiones intrínsecamente desordenadas
IPTG	isopropil- $\beta$ -D1-tiogalactopiranosido
JDP	Proteínas con dominio J
kDa	kilodalton
kV	kilovoltios
LB	medio de cultivo Luria Bertani
LDH	lactato deshidrogenasa
MALDI	del inglés “ <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i> ”
MALDI-TOF	del inglés “ <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight</i> ”
MDa	megadalton
Mw	Peso molecular
NAC	complejo asociado a cadena naciente
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NBD	dominio de unión a nucleótido
NEFs	Factores intercambiadores de nucleótidos
Nm	Nanómetro ( $10^{-9}$ metros)
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PAGE-SDS	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida
PDB	Base de Datos de Proteínas (Protein Database)
PEP	fosfoenolpiruvato
Pi	Fósforo inorgánico
PK	piruvato kinasa

# Abreviaturas

---

PMSF	Fluoruro de metilfenilsulfonilo
RAC	complejo asociado al ribosoma
RE	Retículo endoplasmático
rpm	revoluciones por minuto
SBD	dominio de unión a sustrato
SDS	Dodecil sulfato sódico
Tris	trihidroximetil amino metano

# Summary



---

Molecular chaperones are essential for the appropriate folding of proteins in the cell. One of the main families of molecular chaperones are the so called Hsp70s (Heat shock protein 70kDa), a group of proteins involved not only in protein folding but also in other cellular processes such as apoptosis or DNA replication. This versatility is achieved in part through the interaction with co-chaperones like the Hsp40s and the nucleotide exchange factors (NEFs), which regulate the activity of Hsp70s. All Hsp70s are composed of two main domains, the nucleotide binding domain (NBD), responsible of the structural and functional changes of the chaperone, and the substrate binding domain (SBD), involved in the interaction with the substrate.

DnaK, the main Hsp70 (Heat shock protein 70kDa) protein in bacteria, functions like the rest of Hsp70s through successive rounds of unfolded protein binding and release, controlled by the nucleotide-state of the NBD, in turn controlled by its interaction with Hsp40s like DnaJ, which induces ATP hydrolysis, or with NEFs like GrpE, responsible for accelerating the ADP/ATP nucleotide exchange.

The goal of this thesis is to characterize the interaction between DnaK and GrpE, whose atomic structures are known. A crystallographic structure of a complex between GrpE and DnaK<sub>NBD</sub> has already been published, which nevertheless has not been able to show in full the interaction between the chaperone and its cofactor. The work shown here reveals the structure, determined by electron microscopy and image processing, of the complex between full-length DnaK and GrpE. The structure suggests a more complex interaction between the two proteins since it reveals that both DnaK domains embrace the head of GrpE. Kinetics experiments with a peptide substrate confirm the interaction of the unstructured region of the GrpE tail with the DnaK<sub>SBD</sub> acting as a pseudosubstrate, as it has been already described. These experiments also show an increase of the affinity for the substrate when DnaK is complexed with GrpE. The interaction of DnaK<sub>SBD</sub> with other GrpE regions such as the disordered N-terminal domain, already established, could explain these results. All this suggests that GrpE, besides being a nucleotide exchange factor, has a role in DnaK-peptide binding.





# Introducción



Uno de los procesos celulares fundamentales consiste en la traducción de la información genética en proteínas capaces de llevar a cabo las funciones para las que han sido programadas. La actividad específica de cada proteína se encuentra intrínsecamente ligada a su estructura y ésta, a su vez, depende del ordenamiento de su secuencia aminoacídica. Sin embargo, hay un paso crucial en este proceso, el plegamiento de dichas cadenas polipeptídicas recién sintetizadas a una conformación tridimensional definida (Young *et al.*, 2004), lo que puede ser complicado en el entorno natural de la célula, con una elevada aglomeración proteica (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). En estas condiciones, muchas de las proteínas no logran plegarse por sí mismas y requieren de la ayuda de otras. Las proteínas encargadas de este proceso son las denominadas chaperonas moleculares, capaces de reconocer secuencias polipeptídicas de proteínas desnaturalizadas o recién sintetizadas, y asistir a su plegamiento (Young *et al.*, 2004).

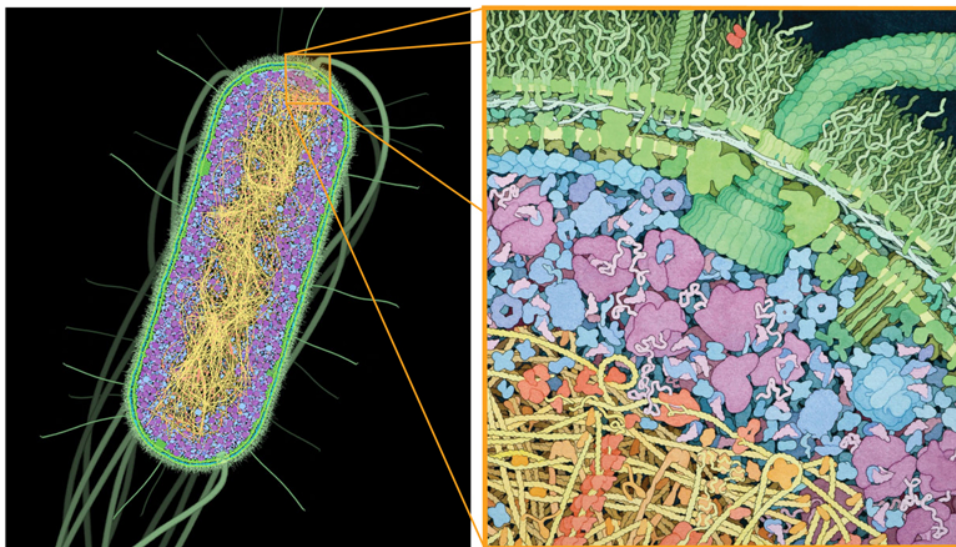
### 1.1 El plegamiento de las proteínas

El mecanismo general por el que las proteínas adquieren su conformación nativa fue descrito por primera vez en los trabajos de Christian Anfinsen, que mostraron que toda la información necesaria para que una proteína alcance su conformación nativa se encuentra implícita en su secuencia aminoacídica (Anfinsen, 1973). Sin embargo, el modo cómo la proteína encuentra esa conformación no se deja al azar, sino que tal y como planteó Cyrus Levinthal (Levinthal, 1968), durante el proceso de plegamiento de una proteína deben existir otros factores que intervienen en él y que conducen de una forma más dirigida y efectiva a la proteína a su conformación nativa y funcional.

No obstante, no todas las proteínas tienen una estructura tridimensional constante, ya que una parte importante de las proteínas se encuentran de forma intrínsecamente desordenada (IDPs) o tienen regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) en situaciones fisiológicas. Estas regiones están asociadas con generalmente con zonas de reconocimiento o interacción entre proteínas (Uversky & Dunker, 2010; Xue *et al.*, 2010). Las fibras amiloides y los oligómeros de muchas proteínas, la mayoría de las cuales poseen IDPs y proteínas con extensas regiones IDRs, como por ejemplo el péptido  $\beta$ -amiloide, la  $\alpha$ -sinucleína, tau, la proteína priónica PrP y la huntingtina, se encuentran directamente asociadas a muchas enfermedades neurodegenerativas (Prusiner, 1998; Uversky *et al.*, 2009).

### 1.2 El medio intracelular como escenario de plegamiento

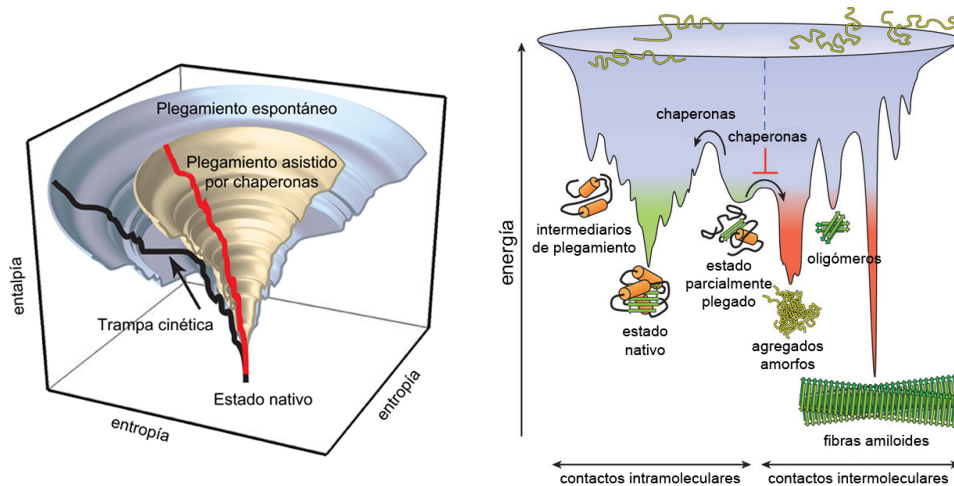
Es conveniente asimismo considerar en este punto la elevada concentración proteica que existe en el interior de la célula, muy diferente a la que se realizan los experimentos *in vitro* (Zhou, 2008; Ellis, 2001; Hartl y Hayer-Hartl, 2002) (**Figura 1.1**). La aglomeración proteica aporta como consecuencias positivas una mejor eficiencia en la transformación de cadenas polipeptídicas en proteínas funcionales o el ensamblaje de estructuras oligoméricas. Esto es debido al aumento en la eficiencia de las interacciones intermoleculares al disminuir el volumen disponible en la disolución. En una solución muy concentrada en proteínas, las macromoléculas tendrán acceso a un volumen mucho menor que el volumen total disponible debido a impedimentos estéricos (Ellis, 2001). Las condiciones de aglomeración en las células se alcanza no sólo por la presencia de macromoléculas, sino también por las altas concentraciones de osmolitos, es decir, compuestos orgánicos de baja masa molecular como polioles, ciertos aminoácidos y metilaminas (Ghebotareva *et al.*, 2004).



**Figura 1.1.** Esta ilustración muestra una sección de *E. coli* y en la derecha, una porción ampliada de la bacteria para poner de manifiesto lo que sería un citoplasma procariota y la elevada concentración proteica que allí se da. Diseño *E. coli* por David Goodsell. (Goodsell, 2009)

En contraposición, a concentraciones tan elevadas las proteínas que no se han plegado se encuentran con residuos hidrófobos expuestos que fácilmente interaccionan con los de otras proteínas en la misma situación. Esto trae como consecuencia agregaciones improductivas que pueden resultar tóxicas para la célula, (**Figura 1.2**). Existen muchas patologías relacionadas con este tipo de formaciones, bien sean formas amorfas, u ordenadas como las fibras amiloides. Estas últimas se encuentran presentes en enfermedades como las de Alzheimer, Parkinson, Huntington, Creutzfeldt-Jakob y la diabetes de tipo II (Ecroyd y Carver, 2008).

Para solventar este tipo de dificultades ante las que se encuentra la célula, a lo largo de la evolución se han desarrollado un tipo de proteínas que se han especializado en asistir al plegamiento de aquellas proteínas que presentan problemas para hacerlo por sí solas. Estas proteínas son las llamadas chaperonas moleculares (Horwich *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2004)

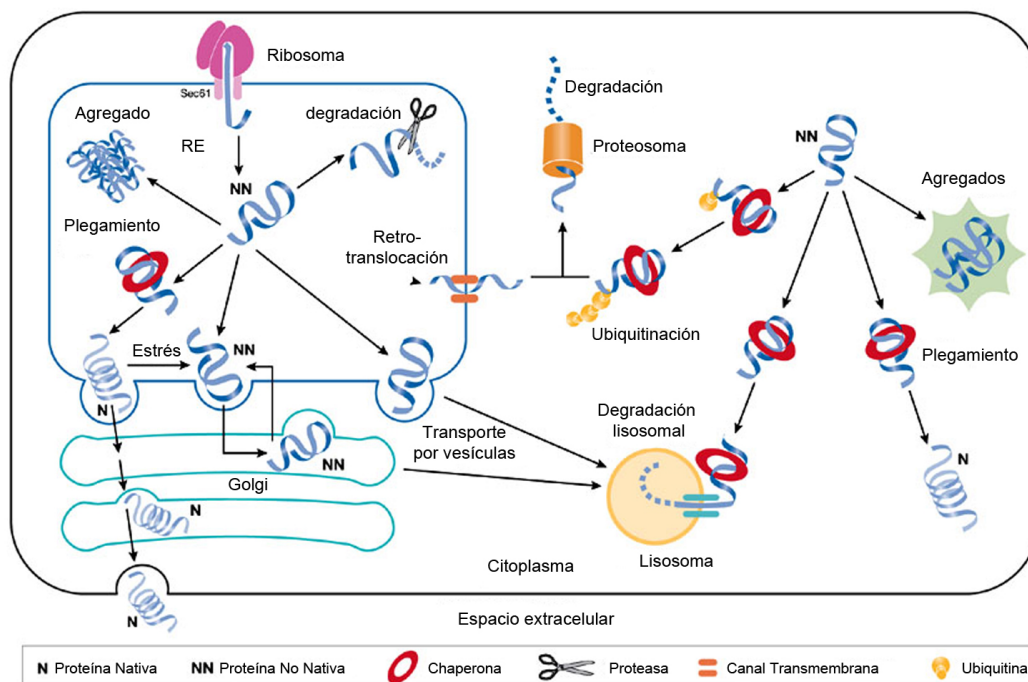


**Figura 1.2. Perfil energético de plegamiento de proteínas y agregados.** Se simboliza de forma esquemática la energía libre asociada a la superficie de una determinada proteína con forma de embudo. El desplazamiento hacia las zonas verdes representa el acercamiento a un estado nativo mediante la formación de contactos intramoleculares (Hartl y Hayer-Hartl, 2009; Jahn y Radford, 2005). La complejidad del perfil de energía libre da lugar a la acumulación de conformaciones cinéticamente atrapadas en los laterales del embudo. Éstas deben atravesar barreras de energía libre hasta alcanzar caminos favorables cuesta abajo. *In vivo*, estos pasos pueden ser acelerados por chaperonas moleculares (Lin *et al.*, 2008; Chakraborty *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2008). Cuando varias moléculas se pliegan simultáneamente en un mismo compartimento, la energía libre asociada a la superficie en el plegamiento puede superponerse a la de agregación molecular dando como resultado la formación de agregados amorfos, oligómeros tóxicos o fibras amiloides (en rojo). La agregación puede iniciarse a partir de intermediarios a elevadas concentraciones durante el plegamiento *de novo* o después de una desestabilización del estado nativo y normalmente se previenen por la presencia de chaperonas (Hartl *et al.*, 2011). Imágenes obtenidas de Hartl *et al.*, 2011 y Chakraborty *et al.*, 2001.

## 1.3 Las chaperonas moleculares al rescate

El término chaperona molecular fue acuñado por primera vez por Laskey y colaboradores en 1978 para describir la función de acompañante o “carabina” de la nucleoplasmina en oocitos de *Xenopus*, una proteína que se une a las histonas para facilitar el ensamblaje del nucleosoma e impide su agregación (Hartl, 1995). En la actualidad el término “chaperona molecular” cobra un significado más amplio y se usa para cualquier proteína que interacciona, estabiliza o ayuda a otra proteína a alcanzar su conformación funcionalmente activa sin estar presente en su

estructura final. Existen muchos tipos de chaperonas no relacionadas estructural ni evolutivamente formando caminos y redes alternativas. Miembros de esta familia de proteínas son frecuentemente conocidas como proteínas de estrés o proteínas de choque térmico (Heat shock proteins, HSPs), ya que su expresión suele verse potenciada bajo condiciones de estrés en las que las concentraciones de intermediarios propensos a la agregación aumentan considerablemente (Hartl *et al.*, 2011).



**Figura 1.3: Control celular en el plegamiento proteico.** En el citoplasma, las proteínas desplegadas (no nativas; NN) son reconocidas por las chaperonas y son dirigidas bien para replegarse o para degradación proteica dependiente de proteosoma o lisosoma (Hohfeld *et al.*, 2001). En el retículo endoplásmico (RE), las proteínas recién sintetizadas u otras parcialmente desplegadas son sustrato potencial de chaperonas para ser conducidas hacia un estado nativo. En el paso de RE a Golgi pueden darse pasos cíclicos de sucesivas rondas de plegamiento de uno a otro compartimento hasta que se alcance el estado nativo y la proteína pueda ser secretada hacia el exterior celular (para proteínas extracelulares). Si una proteína continúa sin tener una estructura tridimensional adecuada puede ser degradada proteolíticamente en el propio RE, transportada al citoplasma y degradada bien por el proteosoma previa ubiquitinación. Existe otra ruta alternativa de degradación o proteólisis a través de lisosoma (Trombetta y Parodi, 2003). Aquellas proteínas que aún siguen sin alcanzar su estructura nativa y no han sido destruidas se encuentran en circunstancias tales que como ya se ha comentado pueden establecer contactos intermoleculares formando agregados que pueden acumularse en depósitos insolubles dentro del RE o en el citoplasma conocidos como agregasomas. (Yerbury *et al.*, 2005; Hartl y Hayer-Hartl, 2009; Jahn y Radford, 2005) Imagen modificada de Yerbury *et al.* (2005).

El mecanismo por el cual las chaperonas previenen la agregación de otras proteínas aún sigue sin estar completamente resuelto pero esencialmente estas proteínas actúan uniéndose a sus sustratos de forma transitoria en las regiones hidrofóbicas que se encuentran expuestas en la superficie polipeptídica. Esto conlleva a un descenso en la probabilidad de que durante el plegamiento se produzcan uniones inespecíficas que impidan que la proteína se pliegue por

completo (Bigotti y Clarke, 2008; Braig, 1998). De esta manera, y mediante uniones y liberaciones controladas, las chaperonas dirigen a las proteínas hacia una conformación nativa, ya sea favoreciendo su plegamiento, el ensamblaje con otras proteínas para formar oligómeros, o facilitando el transporte hacia otros compartimentos (Carrascosa *et al.*, 2001). En la **Figura 1.3** se muestra de forma simplificada los caminos o rutas que experimenta una proteína en relación con su plegamiento y como las chaperonas intervienen según sea necesario.

Las chaperonas son frecuentemente clasificadas en función de su peso molecular (**Tabla I**) y, no obstante, hay que tener en cuenta que así como todas las chaperonas son proteínas de choque térmico, no todas las proteínas de choque térmico son chaperonas (Genevaux *et al.*, 2007). En general, las chaperonas están implicadas en multitud de funciones relacionadas con el mantenimiento del proteoma, entre las que se incluye el plegamiento *de novo*, el plegamiento de proteínas desnaturalizadas, el ensamblaje de oligómeros, el transporte de proteínas y asistencia a degradaciones proteolíticas. Algunas como las Hsp70s, Hsp90s y Hsp60s (chaperoninas), que participan activamente en el plegamiento *de novo* y de especies desnaturalizadas, son máquinas moleculares de múltiples componentes que asisten al plegamiento de proteínas a través de ciclos de unión y liberación de ATP y cofactores que completan su función.

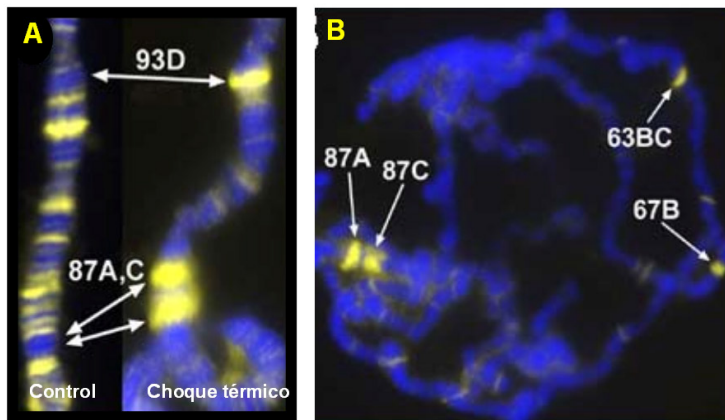
Las Hsps típicamente reconocen las cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos que quedan expuestos en ciertas conformaciones no nativas de una proteína, y pueden cooperar funcionalmente con chaperonas no dependientes de ATP, como las Hsp pequeñas que funcionan protegiendo proteínas sustrato y evitando su agregación (Hartl *et al.*, 2011; Vabulas *et al.*, 2010).

La respuesta al choque térmico fue descubierta por primera vez en 1962 por Ferruccio Rittosa, al estudiar los anillos de Balbiani o *puffs* presentes en los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de *Drosophila*. Estas estructuras son manifestaciones citológicas de la expresión genética (**Figura 1.4**). Rittosa analizó los genes que estaba siendo sobreexpresados en tales condiciones, lo que le permitió identificar una serie de proteínas altamente conservadas cuya expresión se induce en condiciones de elevada temperatura, de ahí su nombre. Poco después de este descubrimiento quedó claro que la síntesis de las Hsps no se incrementa únicamente debido a altas temperaturas sino que también existe una expresión inducida por diversos factores químicos y físicos (Multhoff, 2007).



Tabla I : Proteínas de choque térmico			
Masa molecular	Procariotas	Eucariotas	Características
10 kDa	GroES	Hsp10	Cochaperonina de GroES en bacterias y Hsp60 en mitocondrias y cloroplastos.
14-30 kDa 	Hsp pequeñas, lbpA, lbpB	Hsp pequeñas, $\alpha$ -Cristalina, Hsp27	Forman estructuras oligoméricas dinámicas de entre 9 y 50 subunidades. Entre sus funciones se encuentran la inhibición de la apoptosis, organización del citoesqueleto, solubilización de agregados, contribución al mantenimiento de las membranas y cooperación con otras chaperonas como las Hsp70. Presentes en todos los compartimentos subcelulares. (Haslbeck, 2002; Nakamoto y Vigh, 2007).
40 kDa 	DnaJ	Hsp40, Auxilina	La característica común a todas ellas es la presencia de un dominio exclusivo denominado dominio J. Generalmente cooperan con las Hsp70 para plegar proteínas desnaturalizadas, precisamente interactuando por este dominio. (Hennessy <i>et al.</i> , 2007)
60kDa 	GroEL	Hsp60	Se encuentran en constituyendo oligómeros de hasta 1MDa con forma de barril y compuestos por dos anillos dispuestos espalda contra espalda. Actúan como verdaderas máquinas moleculares con actividad ATPasa, que experimentan sucesivos cambios conformacionales que dan lugar a ciclos de unión y liberación de proteínas parcial o completamente plegadas (Cuéllar <i>et al.</i> , 2008; Saibil, 2008).
70 kDa 	DnaK	Hsp70, Bip, Grp78	Es una de las chaperonas más ubicuas y abundantes en la célula. Además del plegamiento de proteínas también es capaz de realizar funciones muy variadas, gracias a su interacción con otro tipo de factores y cochaperonas más específicas, como Hsp40, factores intercambiadores de nucleótidos ( <i>nucleotide exchange factors</i> , NEFs), o chaperoninas (Saibil, 2008).
90 kDa 	HptG	Hsp90, Grp94	Forma dímeros con actividad ATPasa y está implicada en la estabilidad y el transporte de proteínas implicadas en la regulación celular, metabolismo y señalización. Además, también se encuentra de forma extracelular existiendo diferentes isotipos inducibles en diversos procesos celulares. (Barginear <i>et al.</i> , 2008)
100kDa 	ClpB, ClpA	Hsp104	Grandes oligómeros con actividad ATPasa. Implicados en la supervivencia frente a estrés térmico extremo. Participan en la solubilización dependiente de ATP de agregados proteicos, y en el ensamblaje y desensamblaje de priones.
110 kDa 	-	Hsp110	Son homólogas a las Hsp70 en ocasiones denominadas desplegasas por su capacidad de desplegar proteínas estables y favorecer su agregación. Actúan como factores intercambiadores de nucleótidos para las Hsp70 (Saibil, 2008).



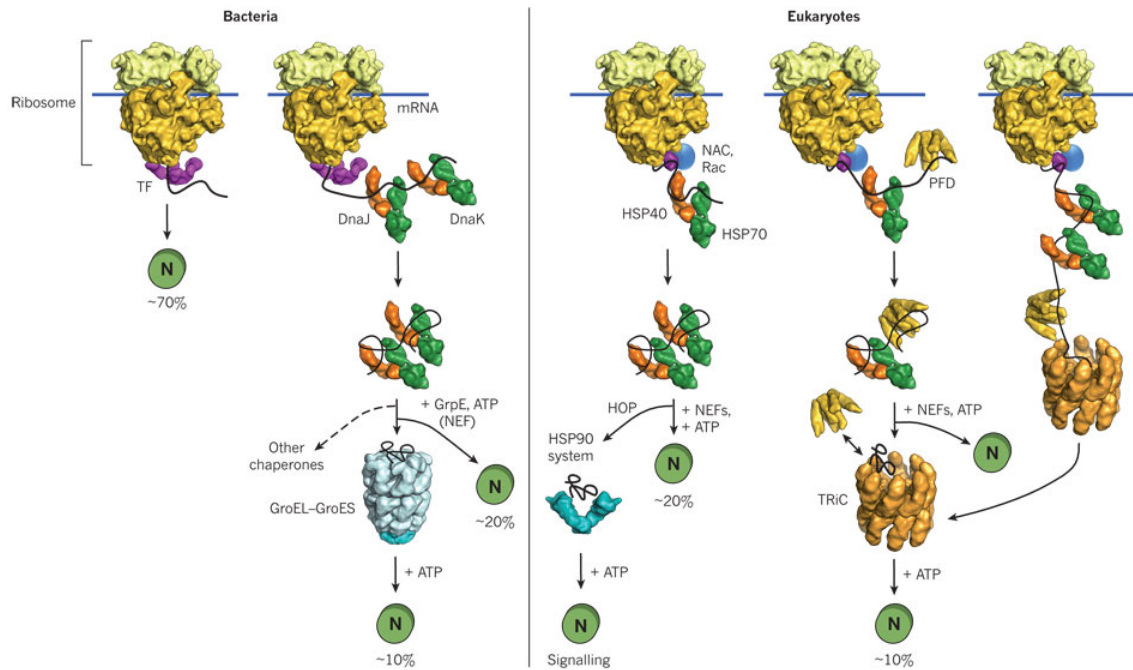


**Figura 1.4: Aumento en la expresión de Hsps en situación de estrés térmico.** Imagen de microscopía de fluorescencia de los Anillos de Balbiani o *puffs* presentes en los cromosomas politénicos de las glándulas salivares de *Drosophila melanogaster*. La tinción diferencial (en amarillo) evidencia las zonas de mayor expresión génica que corresponde a los genes de las Hsps. Imagen modificada obtenida de Nowak y Corces (2000).

## 1.4 Del ribosoma a proteína plegada: procariotas vs. eucariotas

La síntesis vectorial de polipéptidos en el ribosoma tiene implicaciones importantes en el proceso de plegamiento pero éstas sólo son parcialmente conocidas. Las preguntas clave son fundamentalmente las que tienen que ver con la etapa en la que la cadena recién sintetizada por el ribosoma comienza a plegarse y con la medida en la que el proceso de traducción modula el perfil de energía libre relativo al plegamiento (Cabrita *et al.*, 2009). A partir de este momento cobra protagonismo el papel de las chaperonas que actúan como una compleja red en la cual unas interaccionan con otras y diversos cofactores para, tras sucesivas etapas, conseguir alcanzar el correcto plegamiento del sustrato.

Las rutas y redes que intervienen en el plegamiento *de novo* se pueden resumir en dos niveles de organización. En el primero se integraría la maquinaria necesaria para estabilizar las cadenas polipeptídicas según se sintetizan y para iniciar el plegamiento. En el segundo nivel intervendrían los sistemas de chaperonas que completarían el plegamiento hasta un estado nativo y funcional de la proteína (Frydman, 2001; Hartl y Hayer-Hartl, 2002; Langer *et al.* 1992; Albanese *et al.* 2006). Ambos sistemas cooperan en perfecta sincronía de manera que en las etapas iniciales existe una menor especificidad entre sustratos y chaperonas y a medida que avanza el plegamiento el número de interacciones entre ambos son más específicas. De la misma forma, el grado de redundancia funcional chaperona-sustrato disminuye en las etapas finales del plegamiento (Hartl y Hayer-Hartl, 2009). Las rutas de plegamiento son análogas tanto en eucariotas como en procariotas, pero existen ciertas diferencias que se visualizan en la **Figura 1.5** y que se desarrollan a continuación.



**Figura 1.5. Rutas de plegamiento en el citoplasma:** Eucariotas y procariotas presentan rutas análogas de plegamiento, a excepción de algunas diferencias (Hartl y Hayer-Hartl, 2009). Se representa como N a la proteína en estado nativo y justo debajo el porcentaje de proteína plegada respecto de todo el proteoma correspondiente a esa ruta. Estos porcentajes están calculados mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (Teter *et al.*, 1999). Imagen obtenida de Hartl *et al.* (2011).

En el primer nivel de factores se incluirían aquellas chaperonas que se unen directamente a la subunidad mayor del ribosoma, justo a la salida de la cadena polipeptídica, como el factor desencadenante o *trigger factor* bacteriano o en eucariotas una Hsp70 especializada denominada RAC (*ribosome-associated complex* o complejo asociado a ribosoma) (Hundley *et al.*, 2005; Otto *et al.*, 2005) o la proteína NAC (*nascent-chain associated complex* o complejo asociado a la cadena nascente). Estas chaperonas asociadas al ribosoma se encuentran en una posición privilegiada para interaccionar con la mayoría de los péptidos nacientes y se encargan de evitar el compactamiento prematuro de la cadena manteniendo una estructura lineal hasta que se alcance una longitud adecuada en la que exista información estructural suficiente que permita un plegamiento productivo (Brandt *et al.*, 2009). A partir de aquí comienza el segundo nivel en el que ninguna de las chaperonas tiene contacto directo con el ribosoma.

Es en esta etapa, en la que las cadenas polipeptídicas son suficientemente largas para iniciar el plegamiento, es donde aparece el sistema de chaperonas Hsp70 (DnaK en bacterias y Hsc70 ó Hsp70 en eucariotas superiores). Es característico de este nivel el plegamiento co- y post-traduccionales mediados por sucesivos ciclos dependientes de hidrólisis de ATP. La organización en dominios de las grandes proteínas hace necesaria la participación de este tipo de chaperonas para evitar contactos entre dominios y esto hace que se suavicen los perfiles energéticos y disminuyan mínimos locales que pudieran conducir hacia intermediarios no productivos (Netzer y Hartl, 1997; Agashe *et al.*, 2004). Este mecanismo es fundamental y establece diferencias en

la velocidad de plegamiento entre procariotas y eucariotas, debido al mayor porcentaje de grandes proteínas multidominio en estas últimas. Es por ello que en bacterias la media de plegamiento es de unos veinte aminoácidos por segundo mientras que en eucariotas en torno a cuatro. En el sistema de Hsp70 se incluyen otras chaperonas como las Hsp40 (DnaJ en bacterias) que pueden unirse a la cadena nascente e inmediatamente después, como cochaperonas, unirse a Hsp70 y transferir el sustrato. Los factores de intercambio de nucleótidos (NEFs, *nucleotide exchange factors*) desempeñan también una función reguladora extremadamente importante. En ocasiones, la unión a este sistema es suficiente para el plegamiento pero en otros casos no es así, y el sistema Hsp70 como organizador central distribuiría las proteínas parcialmente plegadas a las Hsp60, denominadas GroEL en bacterias y CCT/TRiC en eucariotas, o a las Hsp90s (Kerner *et al.*, 2005; Langer *et al.*, 1992; Frydman *et al.*, 1994; Wandinger *et al.*, 2008; Cuéllar *et al.*, 2008).

Las chaperoninas o Hsp60s son grandes oligómeros sustancia cilíndricos formados por dos anillos dispuestos espalda contra espalda que funcionan encerrando a una molécula de proteína desplegada en un nanocompartimento en forma de jaula para que el plegamiento tenga lugar sin posibilidad

de interacción con otras proteínas, evitando así la agregación. A diferencia de las chaperoninas procariotas, la chaperonina eucariótica citosólica CCT puede interaccionar directamente con Hsp70 (Cuéllar *et al.*, 2008) y con otros cofactores, como con la cochaperona prefoldina (Martín-Benito *et al.*, 2007). Este acoplamiento funcional mediante interacción directa en eucariotas es una consecuencia evolutiva y evita que en ningún momento los sustratos permanezcan libres en el citoplasma (Thulasiraman *et al.*, 1999; Siegers *et al.*, 1999).

Otra chaperona fundamental que recibe sustratos del sistema Hsp70 es la chaperona del tipo Hsp90. La Hsp90 interviene sobre todo en el plegamiento y regulación conformacional de muchas proteínas implicadas en señalización celular. La transferencia de sustratos entre Hsp70 y Hsp90 es promovida, entre otras cochaperonas, por Hop (Wandinger *et al.*, 2008; Zhao y Houry, 2007).

### 1.5 Las Hsp70s como chaperonas

Las Hsp70, proteínas de choque térmico de 70 kDa (*70-kDa heat-shock proteins*), son una familia de chaperonas altamente conservadas durante la evolución, en concreto una de las proteínas más conservadas de todo el proteoma (Lindquist y Craig, 1988; Gupta y Sing, 1994). Estas chaperonas se encuentran presentes en procariotas y en la mayoría de los compartimentos celulares de las células eucariotas, y se caracterizan por tener función ATPasa implicada en su función (Popp *et al.*, 2005).

Las Hsp70 son uno de los componentes más abundantes de la red celular de chaperonas y de la respuesta al estrés (Hennessy *et al.*, 2005). Son capaces de desempeñar funciones muy variadas y complejas dentro de la célula (Ben-Zui *et al.*, 2001; Bukau *et al.*, 2006; Hartl y Hayer-Hartl, 2002) :

- Plegamiento de proteínas recién sintetizadas o desnaturalizadas por estrés celular
- Transporte de proteínas a través de membranas
- Ensamblaje y desensamblaje de complejos proteicos
- Transporte de proteínas inservibles al proteosoma para su degradación
- Regulación de la apoptosis
- Control de la actividad reguladora de ciertas proteínas por ejemplo las quinasas y factores de transcripción

Esta versatilidad se ha conseguido a través de la amplificación y diversificación evolutiva de los genes hsp70. Dicha evolución ha generado Hsp70s especializadas como las Hsp110 o las Hsp170 (Saibil, 2008). La versatilidad también se ha logrado a través de una amplia gama de cochaperonas como las Hsp40 y los NEFs que modulan la actividad de Hsp70. De esta manera, se pueden abarcar funciones específicas y establecer redes como las de una cadena de montaje. Cada vez se conoce más acerca de Hsp70 y sus interacciones, hasta el punto de revelar el mecanismo de interacción de la Hsp70 consigo misma (Bukau *et al.*, 2006).

En general las Hsp70s desempeñan un papel de plegamiento de proteínas en estado no nativo que puede ser analizado como la suma de tres actividades:

1. Prevención de la agregación proteica
2. Asistencia al plegamiento de los sustratos a un estado nativo
3. Asistencia en la reactivación de los agregados proteicos

En la primera actividad la chaperona actúa conjuntamente con la familia de proteínas de dominio J (JDP, *J-domain proteins*) como las Hsp40, mediante la interacción con las regiones hidrofóbicas de los sustratos. En la segunda, funciona como plegadora en sentido estricto, y tras sucesivos ciclos dependientes de la unión e hidrólisis de ATP, la proteína puede alcanzar su estado nativo o parcialmente plegado. En esta función, las Hsp70 también colaboran con las chaperoninas o las Hsp90 en el plegamiento de proteínas. Por último, las Hsp70 cooperan con chaperonas de la familia Hsp100 a través de un complejo mecanismo que aún no está completamente explicado y por el cual son capaces de solubilizar y replegar agregados proteicos (Muga y Moro, 2008).

Tabla II: Hsp70s				
Organismo	Chaperona	Co-chaperona	Localización	Actividad
Procariota	DnaK	DnaJ, GrpE, ClpB	Citoplasma	Plegamiento y transporte de proteínas recién sintetizadas. Es la principal reguladora de la respuesta al choque térmico o estrés celular. Es capaz de coordinar la degradación, agregación y la desnaturalización de proteínas en estas circunstancias.
Eucariota	Hsc70 (Hsp73), Hsp70 (Hsp72)	Hsp40, Hop, Bag-1-5, Hip, HspBP1, CHIP, SGT, Homólogos de las Hsp110, Tom70, Tpr1	Citoplasma	La forma constitutiva (Hsc70) asiste al plegamiento y transporte de las proteínas a los diferentes compartimentos celulares, como mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo. La forma inducida (Hsp70) presenta funciones similares, pero que se dan bajo situaciones de estrés celular en los que aumentan significativamente los niveles de desnaturalización y agregación.
	Hsp70L1	MPP11 (Scz1)	Citoplasma	Asiste al plegamiento de proteínas según salen del ribosoma
	Bip/Grp78	Grp170, Sil1, Sis1	Retículo Endoplásmico	Se unen a los intermediarios de plegamiento y proteínas que necesitan ser translocadas para evitar la agregación. Asimismo están implicadas en la homeostasis del calcio, translocación, plegamiento y transporte de polipéptidos, así como regulador de la respuesta a la desnaturalización proteica.
	mtHsp70 (Grp75/Montalina)	-----	Mitocondria	Plegamiento de proteínas y su transporte en la mitocondria.
	ctHsp70	-----	Cloroplasto	Plegamiento de proteínas y su transporte en los cloroplastos
Referencias: Chang <i>et al.</i> , 2007; Tang <i>et al.</i> , 2007; Macario y Macario, 2005				

En la **Tabla II** se especifica cada una de los componentes del sistema Hsp70 dependiendo del organismo, las cochaperonas asociadas y asimismo la localización celular de cada uno de los componentes.

## 1.6 DnaK, la Hsp70 procariota

El hecho de que DnaK pertenezca a las Hsp70 hace que sus características estructurales y funcionales apenas difieran de las de otros miembros de la familia. Las mayores diferencias se observan a nivel de interacción con sus cochaperonas o cofactores.

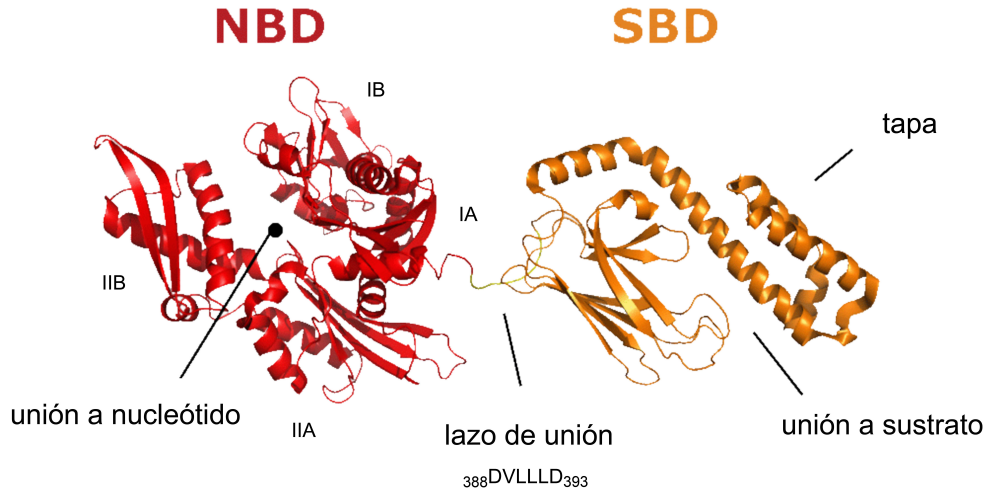
### 1.6.1 La estructura de DnaK

DnaK comparte un 50% de identidad en secuencia con sus homologas procariotas y tiene una estructura similar en todas las especies. A grandes rasgos está formada por dos dominios conectados por un lazo o linker, hidrófobo, muy flexible y fuertemente conservado, que es fundamental en su actividad alostérica (Laufen *et al.* 1999; Han y Christen, 2011), (**Figura 1.6**):

- **Dominio de unión a nucleótido** (NBD o *nucleotide binding domain*): Se trata del dominio amino-terminal y tiene una masa molecular de 44 kDa. Este dominio pertenece a la superfamilia actina/hexoquinasa/Hsp70 con la que comparte muchas características (Bork *et al.*, 1992; Hurley, 1996). Además, este dominio tiene una débil actividad ATPasa necesaria para su actividad chaperona. Su estructura en forma de “V” se divide en dos subdominios globulares (I y II), cada uno a su vez dividido en dos más pequeños (A y B). Los dos subdominios están separados por una profunda hendidura en la cual el nucleótido (ADP o ATP) se une a un átomo de  $Mg^{2+}$  y dos de  $K^{+}$  que conectan los cuatro subdominios (Flaherty *et al.*, 1990). Estudios de Resonancia Magnética Nuclear han demostrado que existe un movimiento de apertura y cierre dentro de los subdominios que puede explicarse en función del nucleótido unido (Gassler *et al.*, 2001).
- **Dominio de unión a substrato** (SBD o *substrate binding domain*): Es la parte carboxi-terminal de la proteína y tiene una masa molecular de 25 kDa (Zhu *et al.*, 1996). Se trata del dominio peor caracterizado y se subdivide a su vez en dos subdominios, el primero, un subdominio  $\beta$  de aproximadamente 15 kDa que une directamente los péptidos hidrofóbicos, y una región de hélices  $\alpha$  de unos 10 kDa (Rüdiger *et al.*, 2007). Esta última región está implicada en unión a cochaperonas y probablemente posee otras funciones aún no bien conocidas (Muga y Moro, 2008). El subdominio  $\beta$ -laminar es capaz de interaccionar con segmentos de aproximadamente siete residuos hidrófobos de las proteínas substrato (Rüdiger *et al.*, 2007). Estos segmentos aparecen en una media de 1 cada 50 o 100 aminoácidos pero están típicamente expuestos en proteínas nacientes o en estado no nativo. Un cambio conformacional en el subdominio  $\beta$  regula la afinidad



por el sustrato (Mayer *et al.*, 2000; Pellicchia *et al.*, 2000). De la misma manera, cuando una molécula de ATP se encuentra unida al NBD, la tapa  $\alpha$ -helicoidal adopta una conformación abierta como si se tratara de una pinza abierta, lo que permite la unión de proteínas desnaturalizadas (Mayer *et al.*, 2000).



**Figura 1.6. Estructura atómica de DnaK.** DnaK está formada por dos dominios claramente diferenciados, el dominio con actividad ATPasa o de unión a nucleótido (NBD) y el dominio de unión a sustrato (SBD). Ambos se encuentran unidos por un lazo o *linker* que es crítico para la función de esta chaperona. (Jiang *et al.*, 2005). Imagen obtenida a partir del pdb 2KHO.

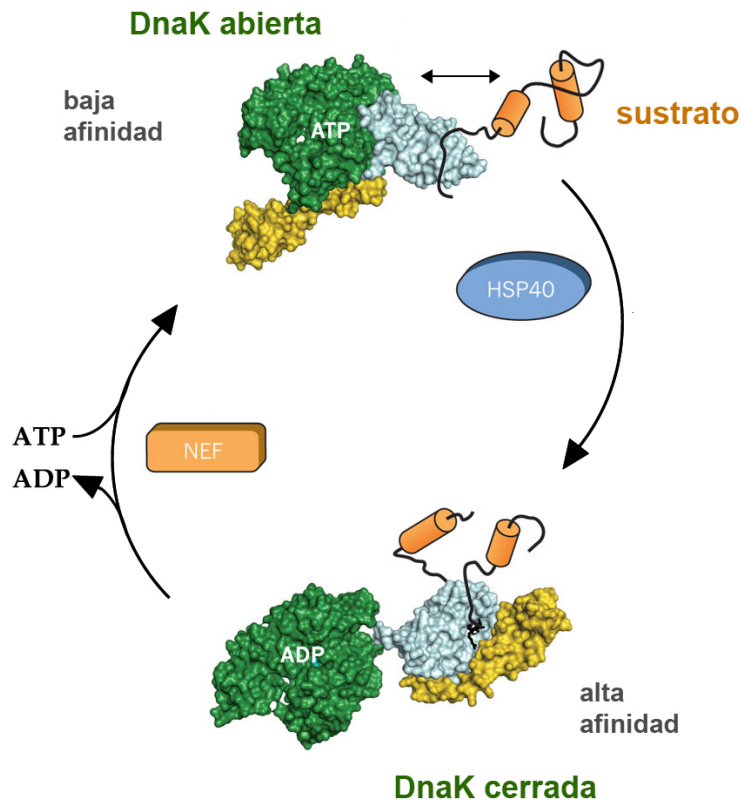
Para el correcto funcionamiento de ambos dominios, como ya se ha descrito previamente, cobra una importancia fundamental la función del lazo de unión o *linker*. La secuencia aminoacídica que lo compone se ha conservado a lo largo de la evolución (<sub>388</sub>DVLLLD<sub>393</sub>). Como cadena de unión entre ambos dominios de DnaK tiene una función fundamental en la comunicación entre los dos dominios de la chaperona (Vogel *et al.*, 2006; Rist *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la Hsc70 bovina en estado libre de nucleótido forma contactos entre el NBD y el SBD (Jiang *et al.*, 2005). Esos contactos se dan entre la parte lateral del subdominio en hélice  $\alpha$  del SBD, que descansa sobre la hendidura que se forma entre los subdominios IA y IIA del NBD. No está del todo claro de qué manera estos contactos pueden interferir en la actividad ATPasa para regular la unión a sustrato, pero sí se sabe que el lazo de unión junto con determinados aminoácidos del NBD (R<sub>151</sub>, K<sub>155</sub> ó R<sub>167</sub>) son fundamentales en la función alostérica de DnaK (Vogel *et al.*, 2006).

### 1.6.2 El ciclo funcional de DnaK

El ciclo de esta proteína es muy similar al que podría desempeñar cualquier Hsp70. El proceso más común en el que DnaK puede trabajar sería asistir en el plegamiento de los sustratos. Los

dos dominios de la proteína participan activamente en el ciclo (Sousa y Lafer, 2006). En la **Figura 1.7** se esquematiza el proceso.



**Figura 1.7: Ciclo funcional de DnaK.** El ciclo presenta diferentes estados de afinidad según se encuentre el NBD (verde) unido ATP o ADP. Mientras que en el primero el dominio SBD (representado por los dominios amarillo y azul) tiene poca afinidad por el sustrato desnaturalizado, en el segundo aumenta su afinidad y atrapa el sustrato como si fuera una pinza. Las proteínas esenciales que acompañan a DnaK son DnaJ (Hsp40) y GrpE como intercambiador de nucleótidos. Imagen modificada de Hartl *et al.*, 2011.

El preciso funcionamiento del dominio ATPásico de las hsp70 implica la interacción con dos familias de dos familias de cofactores también llamadas cochaperonas:

- Las proteínas de dominio J, que catalizan la hidrólisis de ATP (Craig *et al.*, 2006).
- Los NEFs, que asisten en la sustitución de ADP por ATP (Kabani, 2009).

Es por ello que para comprender la función de las Hsp70s a nivel molecular es necesario un análisis sistemático de las bases estructurales y del mecanismo de interacción con esas cochaperonas.

Las Hsp70 alternan entre dos estados de afinidad por las proteínas parcialmente plegadas dependiendo, de la unión e hidrólisis de ATP (Hartl *et al.*, 2011). La unión de ATP al NBD transmite un cambio conformacional al SBD que conduce a la liberación del sustrato plegado en



el ciclo anterior y lo prepara para la unión de una nueva molécula de sustrato que le es presentada por la cochaperona DnaJ. Es el dominio J en esta proteína el que interacciona con DnaK iniciando así el ciclo de plegamiento (Cyr *et al.*, 1994; Hohnfeld y Jentsch, 1997; Schröder *et al.*, 1993). El péptido-sustrato, como ya se ha detallado previamente, presenta regiones hidrófobas expuestas que son reconocidas por DnaK. En este estado DnaK presenta una baja afinidad por el sustrato (Langer *et al.*, 1992; Kerner *et al.*, 2005). La hidrólisis de ATP, que es acelerada por DnaJ (Langer *et al.*, 1992), revierte este cambio y cierra el SBD, que a su vez atrapa al sustrato (Schröder *et al.*, 1993). En este estado cerrado, DnaK presenta una alta afinidad por el sustrato. A continuación se produce la disociación del ADP catalizada por un NEF, en el caso de DnaK por GrpE. Este paso es necesario para que se vuelva a iniciar el ciclo. Es decir, la unión de GrpE acelera la liberación del nucleótido hidrolizado y lo sustituye por un nuevo ATP. De esta manera la unión de ATP abre el subdominio  $\alpha$ -helicoidal del SBD y de nuevo en este estado de baja afinidad se desprende el sustrato unido a DnaK lo que permite una nueva ronda en el ciclo (Langer *et al.*, 1992; Kerner *et al.*, 2005, Hartl *et al.*, 2011).

### 1.6.3 Sustratos del sistema DnaK

DnaK es una chaperona capaz de asistir en el plegamiento a multitud de proteínas diferentes. A continuación se destacan algunas de ellas.

#### 1.6.3.1 Agregados proteicos

Para solubilizar agregados, el sistema DnaK actúa normalmente de forma conjunta con el sistema ClpB, aunque en ciertas ocasiones el nivel de agregación así como el número de interacciones moleculares es menor y este último sistema es prescindible (Mogk *et al.*, 1999). Independientemente del tipo de agregado, la interacción de las chaperonas se produce de forma secuencial, de tal manera que la co-chaperona DnaJ es la primera proteína del sistema que interacciona con el agregado. A continuación DnaJ es capaz de reclutar DnaK de la superficie del agregado, y es entonces cuando DnaK media la unión de ClpB al agregado si es necesario (Acebrón *et al.*, 2008). Esto podría insinuar una unión transitoria de ambas chaperonas, y es esta acción conjunta la que logra ir extrayendo las fibras polipeptídicas de los agregados.

#### 1.6.3.2 Péptidos y proteínas desplegadas

Se ha comprobado que DnaK y DnaJ, al igual que otras chaperonas, reconocen péptidos heptaméricos con abundantes residuos hidrófobos (Gragerov *et al.*, 1994). Gracias a los análisis de datos provenientes de librerías peptídicas se han podido establecer secuencias consenso de reconocimiento que normalmente se repiten cada 36 aminoácidos en muchas proteínas (Rüdiger

*et al.*, 1997). Esta secuencia consenso, aunque no es la misma que la determinada para DnaJ, es sin embargo compatible con ésta y por ello la mayoría de proteínas reconocidas por DnaK lo son también por DnaJ (Rüdiger *et al.*, 1997; Rüdiger *et al.*, 2001). El hecho de que reconozca secuencias hidrófobas hace que DnaK se una sólo cuando estas secuencias, que normalmente permanecen en el interior de la proteína, queden expuestas en el momento en que se produce la síntesis de las proteínas o en estados de desnaturalización (Mayer y Bukau, 2005; Kerner *et al.*, 2005). Como ya se ha comentado, no todas las proteínas procariotas requieren de la ayuda de una chaperona de la familia DnaK para replegarse. No obstante, a pesar de plegar proteínas de pequeño tamaño por lo general, los sustratos que mejor se adaptan al plegamiento por DnaK son proteínas de tamaños superiores a 60 kDa que en ningún caso podrían ser plegadas en la cavidad del sistema de chaperonas procariotas como GroEL/ES, debido a su gran tamaño (Kernel *et al.*, 2005).

### 1.6.3.3 Sustratos nativos

Existen proteínas que aún habiendo alcanzado su estructura nativa aún no son funcionales biológicamente. Algunos de estos sustratos son la proteína  $\lambda$ P del fago  $\lambda$ , Orc4p del complejo ORC, el factor de transcripción  $\sigma^{32}$ , el factor de replicación RepE y el factor de supresión de tumores p53. Sin embargo aún no está completamente esclarecida la manera en que DnaK y DnaJ interaccionan con estas proteínas.

**Proteína P del fago  $\lambda$  ( $\lambda$ P).**  $\lambda$ P junto con  $\lambda$ O y DnaB constituyen un complejo asociado al ADN que se va replicar y que impide que la replicación se inicie (Alfano y McMacken, 1988). Pero para que se reanude la replicación es necesario que DnaK y DnaJ interaccionen con  $\lambda$ P para que este complejo se desestabilice y que DnaB, ya libre, pueda llevar a cabo su actividad helicasa (Zylic *et al.*, 1989).

**Factor de transcripción  $\sigma^{32}$ .** Esta proteína constituye un sustrato nativo DnaK y su actividad es modulada por el conjunto de chaperonas. Sigma 32 ( $\sigma^{32}$ ) es el factor de estrés térmico bacteriano e interviene aumentando la expresión de al menos 20 proteínas, entre ellas DnaJ y DnaK. En condiciones normales DnaK y DnaJ son además capaces de interaccionar con  $\sigma^{32}$  facilitando su despegamiento adicional, lo que le hace susceptible de ser degradado por la proteasa FtsH. En situaciones de elevada temperatura  $\sigma^{32}$ , que posee una estructura flexible y con bastantes regiones desestructuradas, se compacta y estabiliza aumentando su vida media y provocando un incremento en la transcripción de Hsps (Tomoyasu *et al.*, 1998; Tatsuta *et al.*, 2000; Rist *et al.*, 2003). Al aumentar el nivel de proteínas de estrés térmico, aumentan los niveles de desnaturalización de  $\sigma^{32}$  provocando la consecuente degradación de la misma, lo que inhibe de nuevo la transcripción (Liberek y Georgopoulos, 1993).

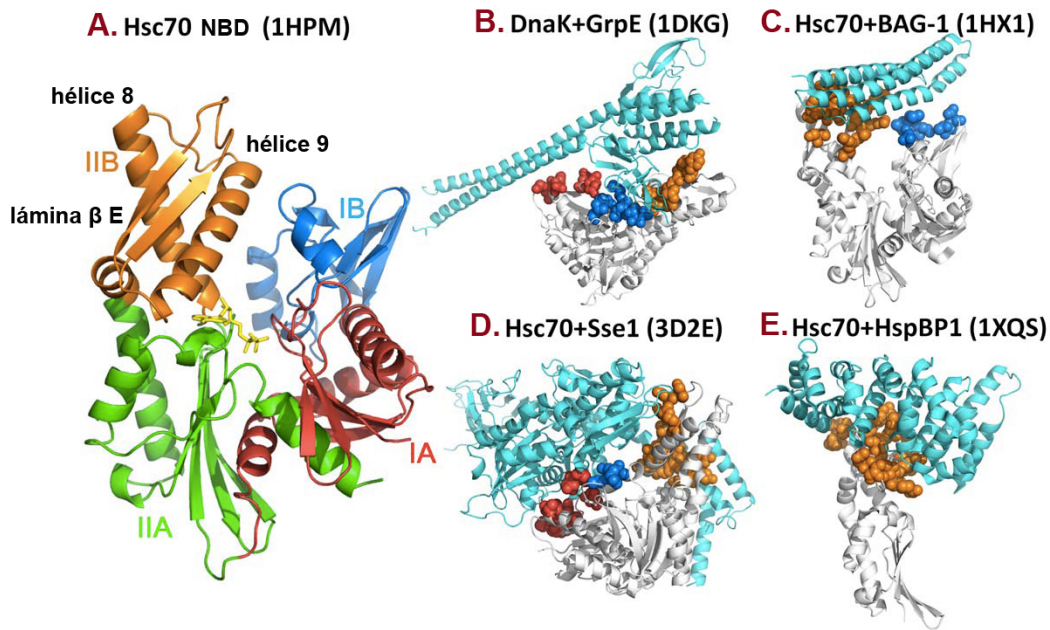
**Factor de replicación RepE:** Esta proteína es el factor de iniciación de la replicación del plásmido mini-F en *E. coli*. RepE regula la replicación del plásmido mini-F a través de sus dos estados de oligomerización dímero/monómero. El dímero de RepE actúa de represor al unirse a la región promotora del plásmido e inhibe la replicación del mismo. De la misma manera, el monómero es capaz de unirse al iterón y como consecuencia iniciar la replicación. Para que RepE se encuentre en forma de monómero es necesario que DnaK interaccione y disocie el dímero (Kawasaki *et al.*, 1990; Ishiai *et al.*, 1994).

### 1.7 GrpE y demás factores de intercambio de nucleótidos

Los NEFs son esenciales para el ciclo funcional de las Hsp70. Son capaces de acelerar el intercambio del ADP hidrolizado por ATP desencadenando la liberación de sustrato. Se han caracterizado hasta la fecha cuatro tipos de NEFs:

- **GrpE**, que facilita la liberación de nucleótido de la DnaK bacteriana y las Hsp70 mitocondriales y de cloroplastos.
- **BAG**, que funcionan como NEF en el citoplasma celular. Junto con otros miembros, BAG forma una familia muy heterogénea de proteínas (Alberti *et al.*, 2003).
- **Fesp1p**, en el citosol de *S. cerevisiae*; HspBP1, su ortólogo humano y S1s1p, en el lumen del RE también de *S. cerevisiae*.
- **Hsp110**, un tipo de chaperonas perteneciente a la familia de las Hsp70, que además de tener propiedades parecidas a estas chaperonas, funciona también como NEF. En mamíferos destaca Sse1.

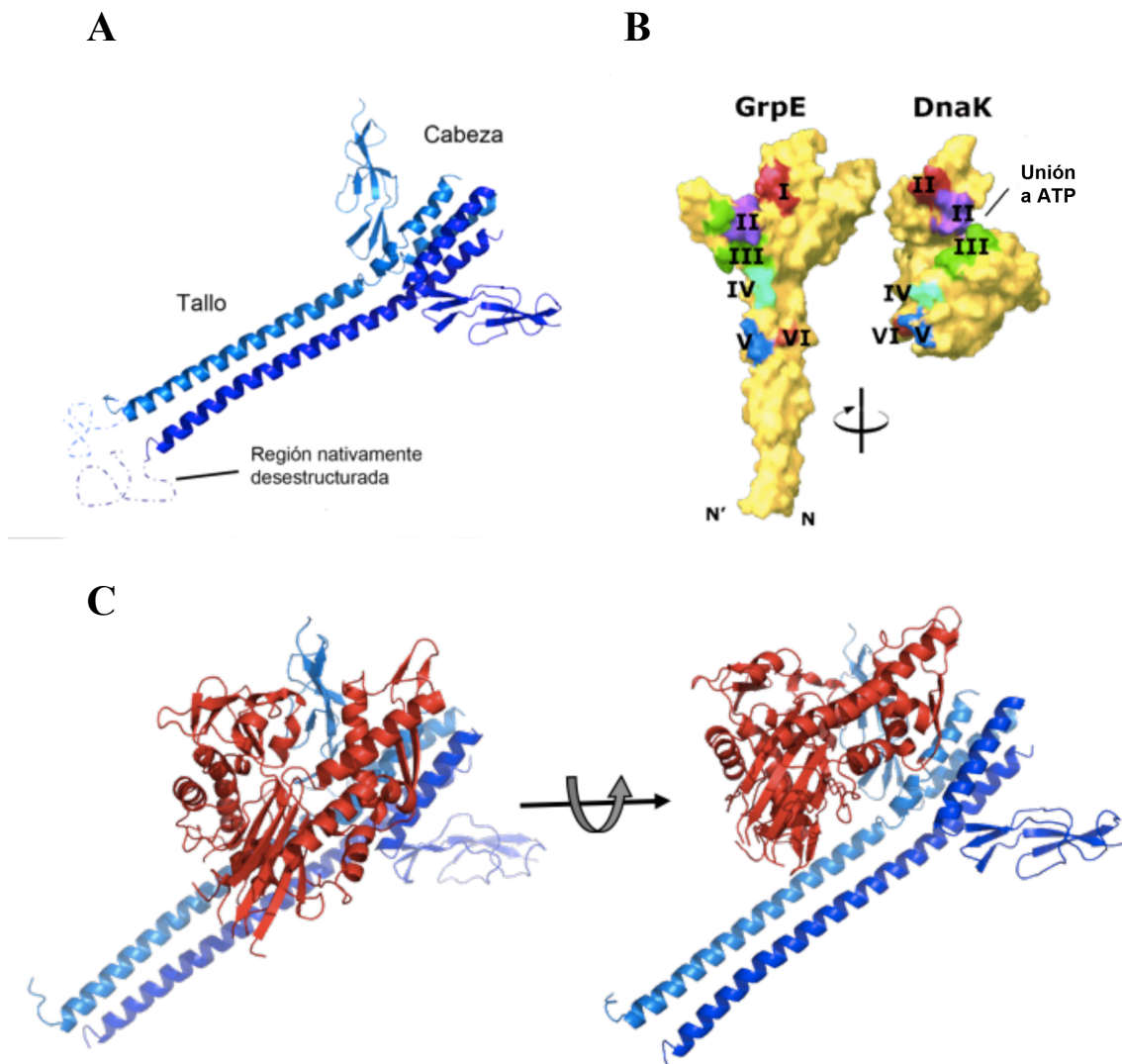
Según se va descubriendo más sobre los mecanismos de acción de estos NEFs, se va reafirmando la idea de que existe una gran diversidad funcional y de interacción de estas proteínas con sus respectivas chaperonas, aunque también tienen características comunes entre ellas. Existen estructuras de cada uno de ellos formando complejos con el NBD de sus respectivas chaperonas (Bukau *et al.*, 2006), (**Figura 1.8**). Las estructuras tridimensionales de Hsp70 unida a los diferentes NEFs (**Figura 1.8B-E**) muestran una gran variedad de geometrías de unión y las superficies de interacción con el NBD de Hsp70.



**Figura 1.8: Estructura del dominio de unión a nucleótido (NBD) de las Hsp70 y su interacción con diferentes NEFs.** A. Hsp70 NBD coloreada por subdominios. Varios regiones de IIB están implicados en la interacción con los NEFs , incluida una parte de la hélice 8 y 9, así como, la lámina  $\beta$  E. Esta estructura corresponde a la entrada 1HPM del PDB. En amarillo aparece representada la molécula de ADP necesaria para la interacción. B. DnaK NBD de *E. Coli* unida a GrpE. C. Hsc70 bovina interaccionando con BAG-1. D. Hsc70 humana unida a Sse1 (Hsp110). E. Hsc70 humana unida a HspBP1. En cada caso, el NEF está coloreado de azul cian, el NBD de la Hsp70 en blanco y las zonas de contacto en representación de superficie coloreada según el subdominio. Imagen adaptada de Liu *et al.* en 2010.

La comparación de estas estructuras ponen de manifiesto la existencia de los múltiples mecanismos desarrollados para acelerar en intercambio de nucleótidos. Lo más probable es que se deba a las diferentes conformaciones que estos NEFs pueden adoptar dentro del complejo. A pesar de estas diferencias, todos los NEFs tienen en común la deformación que provocan en el subdominio IIB del NBD (Harrison *et al.*, 1997; Sondermann *et al.*, 2001; Shomura *et al.*, 2005; Muga y Moro; 2008). Las diferencias estructurales entre los diferentes NEFs también pueden estar relacionadas con la diversidad mecánica que estos sistemas de chaperonas presentan para la adaptación al estrés térmico (Muga y Moro; 2008). De ahí la importancia de su estudio para terminar de comprender de qué manera inducen los cambios conformacionales a DnaK y cómo se sincronizan sus acciones.

El NEF GrpE (*GroP-like gene E*) fue identificada en 1997 por Saito y Uchida al realizar una búsqueda genética de mutantes que no fueran capaces de propagar el fago  $\lambda$  en *E. coli*. GrpE actúa como un factor intercambiador de nucleótidos que facilita el intercambio de ADP por ATP a la vez que estimula la liberación del sustrato (Harrison, 2003).



**Figura 1.9: Estructura de GrpE y su interacción con DnaK.** **A.** El dímero consta de 22 kDa por subunidad. Se puede diferenciar en la estructura dos regiones denominadas tallo y cabeza. En la cabeza se encuentran los dominios de sándwich  $\beta$  y hélice  $\alpha$ , estos últimos interaccionando entre sí para formar el dímero. El tallo está formado por dos hélices  $\alpha$ , una de cada monómero y una última región aminoterminal de 33 aminoácidos de estructura nativamente desestructurada. **B.** Regiones implicadas en la interacción. **C:** Estructura tridimensional de la interacción GrpE:DnaK (NBD). Imagen A y C creada a partir de l PDB:1DKG publicado por Harrison *et al.* en 1997 y visualizada con el programa *Swiss-Pdbviewer* desarrollado por Guex y Peitsch en 1997. Imagen B obtenida de Harrison *et al.* en 1997

La estructura atómica de GrpE de *E. coli* fue dilucidada por Harrison *et al.* en 1997 a partir del complejo cristalizado de GrpE y el NBD de DnaK. Es importante precisar que en el cristal de GrpE se encuentran ausentes los 33 primeros aminoácidos (se trata de un mutante inactivo  $\Delta 1-33$ , G122D), ya que se ha demostrado que estos residuos presentan una estructura desordenada que dificulta su cristalización. GrpE es un dímero formado por dos monómeros de 22 kDa cuya expresión en *E. coli* está regulada por el factor de transcripción  $\sigma^{32}$ , como en el caso de DnaK y

DnaJ. El monómero de GrpE consta de 197 aminoácidos. Como se muestra en la **Figura 1.9A**, GrpE consta de tres dominios estructurales: un dominio amino-terminal que forma una hélice  $\alpha$  de 100 Å de longitud, dos pequeñas hélices  $\alpha$  implicadas en la dimerización que se conectan al dominio anterior mediante un giro, y por último, un dominio carboxi-terminal formado por un sándwich  $\beta$  de 6 cadenas.

Existe una segunda estructura más de GrpE, en este caso de *Thermus thermophilus* HB8 que revela una arquitectura común (Nakamura *et al.*, 2009). Dicho cristal añade información acerca de una posible malinterpretación en la unión de dos cadenas polipeptídicas de la cabeza, pero esto será debatido más adelante en el apartado de **Discusión**.

### 1.8 GrpE y su interacción con DnaK

GrpE y DnaK forman un complejo muy estable en estado de ADP, resistente incluso a elevadas concentraciones de sal pero que rápidamente se disocia en presencia de ATP (Zylicz *et al.*, 1987). Se ha demostrado que en el momento en que DnaK interacciona con GrpE la velocidad de disociación del ADP aumenta en torno a 5000 veces (Packschies *et al.*, 1997). Parte de la estabilidad del complejo se explica por la extensa superficie de contacto entre DnaK-NBD y la cabeza de GrpE, en torno a 2800 Å<sup>2</sup> (Harrison *et al.*, 1997; Janin, 1995; La Conte *et al.*, 1999). La mayoría de los contactos entre estas dos proteínas se dan entre la zona de sándwich  $\beta$  de GrpE que queda encajada entre la hendidura de unión a nucleótido de DnaK. También existen otras zonas como las situadas en los dos pares de hélices de la cabeza de GrpE al dominio IIB de DnaK o la parte superior de la doble hélice del tallo que interacciona con algunos giros de DnaK<sub>NBD</sub> cercanos al lazo de unión al dominio SBD (Harrison *et al.*, 1997).

Los experimentos hidrodinámicos han revelado que GrpE forma un complejo de estequiometría GrpE:DnaK 2:1 (Schonfeld *et al.*, 1995). La estructura cristalográfica del complejo GrpE:DnaK<sub>NBD</sub> pone de manifiesto que GrpE pese a ser un homodímero es asimétrica y que tan sólo uno de los monómeros interacciona con el dominio DnaK<sub>NBD</sub> (**Figura 1.9B y C**). Los residuos implicados en la interacción pertenecen regiones del sándwich  $\beta$  de GrpE y el dominio formado por las dos hélices  $\alpha$  de menor longitud. Recientemente se ha obtenido una segunda estructura cristalográfica de DnaK interaccionando con GrpE en la cual la estequiometría de unión es 2:2 (Wu *et al.*, 2012). Este modelo es ciertamente controvertido al entrar en conflicto con todas las publicaciones previas.

Según varios estudios, es probable que la parte amino-terminal de las hélices  $\alpha$  sea responsable de la estabilidad del complejo GrpE:DnaK en la conformación con ADP, y del intercambio de

nucleótido mediante su interacción con el lazo de DnaK y también probablemente con el DnaK<sub>SBD</sub> (Moro *et al.*, 2007). Esto pone de manifiesto que aún no está clara la manera en que DnaK y GrpE interaccionan. No hay experimentos concluyentes sobre si DnaK<sub>SBD</sub> participa de alguna manera en la interacción, y es por ello que uno de los objetivos de esta tesis es tratar de dilucidar cómo funciona el complejo en su totalidad.

Por otro lado varios autores han señalado que GrpE realiza además una función termosensora en el sistema de DnaK. A temperaturas superiores a 40 °C, momento en el que se disparan las rutas de choque térmico, la parte amino-terminal del dímero, incluyendo las hélices  $\alpha$ , se desestabiliza de forma reversible. Esto interfiere de forma directa provocando una disminución en la tasa de intercambio de ADP por ATP y por tanto el sustrato permanece más tiempo unido a DnaK. Esto supondría una protección del sustrato frente a las situaciones de estrés térmico al evitar así la agregación (Grimshaw *et al.*, 2001; Grimshaw *et al.*, 2005).





# Objetivos



- 
1. La determinación estructural de la interacción entre la chaperona molecular DnaK y GrpE mediante técnicas de microscopía electrónica y procesamiento de imagen.
  2. La caracterización cinética del complejo mediante técnicas biofísicas y bioquímicas.



# **Materiales y Métodos**



### 3.1 Purificación de proteínas

Las muestras de DnaK y GrpE se expresaron y purificaron en el laboratorio de los Dres. Arturo Muga y Fernando Moro, de la Unidad de Biofísica en la Universidad de País Vasco (Lejona).

#### 3.1.1 Purificación de DnaK

En la purificación de DnaK se siguió el método ya descrito por Moro et al., (2003). Las células de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pBAT-DnaK se cultivaron en 3 litros de medio LB con ampicilina (0,1 mg/ml), a 37 °C en un incubador con agitación continua hasta alcanzar la fase exponencial ( $DO_{600}=0,6$ ). En este momento la sobreexpresión de DnaK se indujo con IPTG a una concentración final de 1mM. Pasadas 3 horas de la inducción, el cultivo se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió en 50 ml de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 50 mM NaCl; 1mM EDTA). Dicho extracto se lisó sometándolo a 30 ciclos de sonicación de 20 segundos con intervalos de descanso de 30 segundos a 4 °C en un sonicador *Sonyprep 150 (MSE)*. El lisado celular se centrifugó durante 45 minutos a 35000 rpm en un rotor *Beckman 70.38*. El sobrenadante se cargó en una columna de intercambio aniónico, *HiLoad Q-sepharosa 16/10 HP (GE Healthcare)* acoplada a un sistema *ÄKTApurifier (GE Healthcare)*, y equilibrada en tampón A<sub>K</sub> (20mM Tris-HCl pH 7,2; 50 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 2mM DTT). La fracción de proteína unida a la resina se eluyó con un gradiente de 4 volúmenes de columna desde 50 a 500 mM de NaCl. Las fracciones con DnaK se recogieron y, tras la adición de 5 mM MgCl<sub>2</sub>, se incubaron durante toda la noche a 4 °C en agitación en una resina de ATP-agarosa (*Sigma-Aldrich*) equilibrada en tampón B<sub>K</sub> (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 100 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 5 mM MgCl<sub>2</sub>). La resina se empaquetó en una columna de 5 ml y a continuación se lavó en tampón B<sub>K</sub> con 2M NaCl. Las proteínas adheridas se eluyeron con 4 volúmenes de tampón B<sub>K</sub> en presencia de 5 mM ATP. Esta fracción se dializó durante 12 horas a 4 °C frente a tampón C<sub>K</sub> (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,8; 15 mM β-mercaptoetanol) y se cargó en una columna de hidroxapatito de 15 ml equilibrada con tampón C<sub>K</sub>. A continuación, la proteína se eluyó con 7 volúmenes de un gradiente 0-200 mM NaHPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,8. La fracciones que contenían DnaK pura se concentraron mediante filtros de centrifugación *Amicon30 (Millipore)* y se dializaron frente a 1 litro de tampón D<sub>K</sub> (20 mM imidazol pH7,2; 2 mM EDTA) durante 24 horas con 5 cambios de tampón con el fin de eliminar el nucleótido unido a DnaK. Como último paso, la muestra se dializó frente a 1 litro de tampón E<sub>K</sub> (25mM HEPES pH7,6; 50 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT; 10% glicerol (v/v)). Se comprobó que el nucleótido había sido correctamente eliminado midiendo la relación de absorbancia entre 260

y 280 nm cuyo valor adecuado ha de ser igual o menor a 0,7. La proteína, una vez alicuotada, se congeló en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarla a -80°C.

### 3.1.2 Purificación de DnaK<sub>R151A</sub>

La purificación del mutante DnaK<sub>R151A</sub>, que tiene inhibida la función alostérica entre sus dominios, se realizó siguiendo el mismo protocolo que para DnaK, pero a partir del plásmido de expresión cedido por el profesor Matthias Mayer (ZMBH; Heidelberg; Alemania) (Taneva *et al.*, 2010)

### 3.1.3 Purificación del dominio de unión a nucleótido de DnaK (DnaK<sub>NBD</sub>)

En este caso, el mutante también denominado DnaK<sub>I-385</sub>, se purificó siguiendo el mismo protocolo que para DnaK pero a partir del plásmido descrito en Moro *et al.* (2003).

### 3.1.4 Purificación de GrpE

GrpE se purificó siguiendo el método ya descrito en Moro *et al.* (2007). Las células de *E. coli* BL21(DE3), transformadas con el plásmido pET3a portador del gen de GrpE, se cultivaron en un litro de medio LB con 0,1 mg/ml ampicilina a 30 °C en un incubador con agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,6. La expresión de la proteína se indujo durante 4 horas con IPTG a una concentración final de 1mM. A continuación, se precipitaron las células mediante centrifugación para posteriormente ser resuspendidas en un tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH7,5; 2mM DTT; 4mM EDTA; 0,1 mg/ml lisozima; 2mM PMSF). Las células se sonicaron a 4 °C con 30 ciclos de 30 segundos e intervalos de descanso de 30 segundos. El lisado celular obtenido se centrifugó durante 30 minutos a 35000 rpm en un rotor *Beckman 70.38*. El sobrenadante se precipitó con sulfato amónico al 60% (p/v) con agitación, durante 12 h y a 4 °C. La muestra se centrifugó en un rotor *Beckman 70.38* a 30000 rpm durante 45 min a 4 °C. Seguidamente, el precipitado se solubilizó en tampón A<sub>E</sub> (25 mM HEPES pH 7,6; 0,5 mM EDTA; 1mM DTT; 10 % glicerol (v/v)). La muestra se inyectó en una columna de intercambio iónico *HiLoad Q-sepharose 16/10 HP (GE Healthcare)* acoplada a un sistema *ÄKTApurifier (GE Healthcare)* equilibrada con el tampón A<sub>E</sub> y se eluyó con un gradiente de 4 volúmenes de columna desde 0 a 0,5 M de NaCl. Las fracciones que contenían GrpE se unificaron y dializaron durante toda la noche a 4 °C frente a tampón B<sub>E</sub> (25 mM HEPES pH 7,6; 50 mM KCl; 5mM MgCl<sub>2</sub>; 2mM DTT; 10 % glicerol (v/v)). La muestra dializada se cargó en una columna *Affi-gel Blue (Bio-Rad)* de 50 ml, previamente equilibrada con tampón B<sub>E</sub>. Se recogieron las fracciones correspondientes al pico principal en el perfil de absorción a 280 nm, tras confirmar en geles de



poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes que contenían la proteína pura. Posteriormente, la proteína se dializó frente a un litro de tampón B<sub>E</sub> durante toda la noche y a 4 °C. A continuación, se concentró mediante filtros de centrifugación *Amicon10* (Millipore) y seguidamente se alicuotó y congeló con nitrógeno líquido para ser almacenada a -80 °C.

### 3.1.5 Purificación de GrpE<sub>34–197</sub>

La versión truncada de GrpE en sus primeros 33 residuos, GrpE<sub>34–197</sub>, se obtuvo utilizando el método de Moro *et al.*, (2007), que consiste en la digestión de GrpE con papaína a una relación molar de 125:1 respectivamente, durante 90 min a 25 °C. En este punto la reacción se inhibió con 50 µM de E-64 y la proteína truncada se purificó en una columna *HiLoad Superdex 75 16/60* (GE Healthcare) acoplada a un sistema *ÄKTApurifier* (GE Healthcare) y previamente equilibrada en tampón B<sub>E</sub>. La secuencia de la proteína resultante se confirmó mediante Espectrometría de Masas y secuenciación amino-terminal.

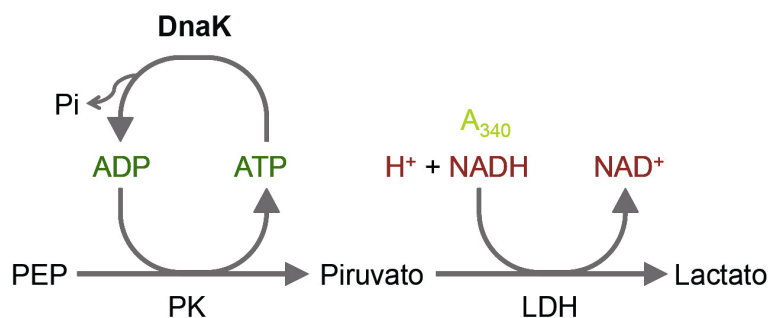
### 3.1.6 Purificación de GrpE<sub>69–197</sub>

El mutante de eliminación GrpE<sub>69–197</sub> se clonó en el vector pET3a según se describe en Moro *et al.* (2007). La proteína se purificó a partir de células BL21(DE3). El resto de pasos de purificación coinciden con los descritos para la purificación de GrpE.

## 3.2 Actividad ATPasa de DnaK

Para caracterizar la actividad ATPasa de DnaK en su estado estacionario se utilizó un método espectroscópico acoplado a la regeneración de ATP (Kreuzer y Jongeneer, 1983). Este método acopla la generación de ADP por parte de una proteína a la actividad de dos enzimas: piruvato kinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH) tal y como se muestra en la **Figura 2.1**. La primera regenera el ATP a convirtiendo el fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato, mientras que la segunda utiliza el producto de la reacción anterior, el piruvato, como sustrato en la reducción del NADH. Este compuesto posee su máximo de absorbancia a 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) mientras que el producto de reacción, NAD<sup>+</sup>, tiene un coeficiente de extinción insignificante a esa longitud de onda. De esta manera puede seguirse la degradación del NADH espectroscópicamente y calcular en base a ésta la actividad ATPasa. El tampón de ensayo utilizado se compone de 40 mM HEPES pH 7,6; 50 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM NADH<sup>+</sup>; 2 mM PEP; 12,5 ng/ml PK; 25 ng/ml LDH; 1mM ATP. Una vez comprobada que la absorbancia de la disolución permanecía constante se añadió DnaK (2 µM). Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro *Cary 3 Bio* (Varian). La velocidad de hidrólisis de ATP expresada en

moles de ATP/min se determinó a partir de las pendientes de la variación temporal de la absorbancia, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del NADH.



**Figura 3.1: Diagrama del sistema acoplado utilizado para medir la actividad ATPasa.** La actividad ATPasa de DnaK genera ADP y fosfato inorgánico (Pi). El ADP junto con el PEP presente en el medio actúan como sustratos de la enzima piruvato quinasa (PK) que cataliza la conversión del PEP en piruvato con la consecuente regeneración de ATP. Este ATP puede unirse de nuevo a DnaK para comenzar un nuevo ciclo de hidrólisis. El piruvato formado es a la vez sustrato junto al NADH del medio, de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), quien reduce el piruvato generando lactato. Es así como se consume el NADH del medio y se genera NAD<sup>+</sup>. El NADH presenta un pico de absorción a 340 nm mientras que el NAD<sup>+</sup> no absorbe a esta longitud de onda. Por lo tanto, midiendo la disminución de la absorbancia a 340 nm en el tiempo se puede calcular la actividad ATPasa de DnaK.

### 3.3 Purificación de ADP

El ADP (*Sigma-Aldrich*) utilizado para en las interacciones de DnaK se purificó para eliminar el ~5% de ATP que contiene el producto comercial (Horst *et al.*, 1996). Se inyectó ADP a una concentración de 25 mM en 100 mM de (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> en una columna *Mono Q HR 10/10 (GE Healthcare)* equilibrada en el mismo tampón. Se eluyó la muestra en un gradiente de 8 volúmenes de columna de (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> desde 100 a 300 mM, y se centrifugaron las fracciones correspondientes al segundo pico de la elución a 10000 g durante 1 h a 4°C. El precipitado se resuspendió en etanol al 100% y se volvió a centrifugar. El precipitado final se solubilizó en 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) y se alicuoteó y congeló a -20°C.

### 3.4 Ensayos de Interacción

#### 3.4.1 Ensayo de interacción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas

Esta técnica permite la detección de proteínas en estado mediante electroforesis en su estado más próximo al nativo, y se basa, como algunos métodos cromatográficos, en la separación de las proteínas y complejos macromoleculares atendiendo a su masa, que atraviesan el reticulado

producido por el gel a una velocidad menor cuanto mayor sea su tamaño. De esta forma, se preincubaron 0,1  $\mu\text{mol}$  de DnaK a 25 °C en tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM KCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 mM ADP. Tras 5 minutos se añadió GrpE hasta un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ , para establecer una relación molar 1:1 (DnaK:dímero GrpE), que se incubó durante 20 minutos a 25 °C.

La muestra previamente descrita se analizó en geles de acrilamida/bisacrilamida en gradiente del 3 al 8 % en condiciones nativas (30 mM Tris-HCl pH 8; 200 mM glicina). así como dos controles adicionales correspondientes a GrpE y DnaK por separado tratados en las mismas condiciones. La electroforesis se desarrolló limitando la intensidad de corriente a 10 mA y manteniendo una diferencia de potencial de 70 V durante 3 horas y a una temperatura ambiente de unos 23 °C. Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñó con solución de Coomassie (1mM Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad); 48% v/v etanol, 25% v/v ácido acético glacial).

### **3.4.2 Purificación de los complejos DnaK/GrpE y DnaK<sub>NBD</sub>/GrpE por cromatografía de filtración en gel**

Para obtener complejos aislados de DnaK:GrpE se realizó una cromatografía de exclusión molecular llevando a cabo los siguientes pasos. Se preincubó DnaK a 25 °C y a una concentración final de 20  $\mu\text{M}$ , en un tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM KCl; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 mM ADP. Tras 5 minutos se añadió GrpE a una relación molar 1:1 (DnaK:dímero GrpE) y se incubó durante 20 minutos a 25 °C. Se centrifugaron 150  $\mu\text{l}$  de la muestra durante 10 minutos a 10000 rpm en una microfuga *Eppendorf*, y a continuación se inyectaron en una columna *Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare)* conectada a un sistema *ÅKTAprime (GE Healthcare)*, que previamente había sido equilibrada con el mismo tampón de la incubación. Se mantuvo un flujo de 0,2 ml/min y se recogieron fracciones de 200  $\mu\text{l}$ . Posteriormente, las fracciones correspondientes a los picos de elución observados en el cromatograma se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Siguiendo los mismos pasos, y como control, se cargaron por separado GrpE y DnaK para comprobar que ambos picos de elución se encontraban desplazados respecto al del complejo.

Utilizando la misma metodología, se purificaron los complejos de DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE, con las diferencias de que, en este caso, se utilizó DnaK<sub>NBD</sub> en exceso para alcanzar una relación molar de 3:1, y que para la cromatografía se utilizó una columna *Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare)*.

### 3.4.3 Cinéticas de unión a sustrato

Para determinar las diferencias de afinidad entre un sustrato y los distintos complejos de DnaK:GrpE se realizaron medidas de fluorescencia basándose en las diferencias de emisión del péptido  $\alpha$ -N,dansyl-NRLLLTG, denominado dNR (Neosystem). Se eligió este sustrato porque el grupo dansilo acoplado al péptido permite detectar si éste está unido a DnaK, debido a que en estado libre la emisión de fluorescencia es menor. El tampón utilizado en estos ensayos fue 20 mM Hepes pH 7,6, 50 mM de KCl, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> y se tomaron medidas para las siguientes combinaciones:

- Control DnaK
- DnaK:GrpE
- DnaK:GrpE<sub>34-197</sub>
- DnaK:GrpE<sub>69-197</sub>
  
- Control DnaK<sub>R151A</sub>
- DnaK<sub>R151A</sub>:GrpE
- DnaK<sub>R151A</sub>:GrpE<sub>34-197</sub>
- DnaK<sub>R151A</sub>:GrpE<sub>69-197</sub>

Una vez incubados estos complejos en presencia de ADP (0,5 mM) con una concentración de 1  $\mu$ M DnaK y 4  $\mu$ M GrpE a 25 °C durante 30 min, se introdujeron en la cubeta del espectrofluorímetro y se añadió como sustrato 1  $\mu$ M dNR. Las cinéticas se registraron en un espectrofluorímetro *Fluorolog (Jobin Ibon)*. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 335 y 535 nm, respectivamente, y se empleó una apertura de rendija 4x4. Para confirmar que se produjo unión se añadió 1 mM ATP al final del experimento para provocar la disociación del complejo.

### 3.5 Proteólisis parcial con papaína

Para obtener información complementaria sobre la estructura global del complejo se realizaron experimentos de proteólisis enzimática. El nivel de accesibilidad de la enzima a sus sustratos se revela indirectamente por el grado de digestión de las proteínas que se encuentran interaccionando entre sí y por lo tanto protegen sus estructuras.

La digestión parcial se realizó a 25 °C en presencia de 20 mM HEPES pH 7,6; 50 mM KCl; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. La papaína liofilizada (*Sigma-Aldrich*) se disolvió en 20mM de HEPES pH 7,6; 50

mM de KCl y se activó mediante la adición de 50 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol y posterior incubación a 37 °C durante 30 min.

Para la formación de complejos, DnaK (20  $\mu$ M) se incubó durante 5 min a 25 °C, bien con 2,5  $\mu$ M ADP, con 2,5  $\mu$ M ATP o en ausencia de nucleótido. A continuación se añadió GrpE, GrpE<sub>34-197</sub> ó GrpE<sub>69-197</sub> (30  $\mu$ M/dímero) y las muestras se incubaron durante 20 min para facilitar la formación de complejos estables. La proteólisis se inició mediante la adición de papaína activa en dos relaciones molares DnaK:papaína, 120:1 y 70:1. La reacción de digestión se mantuvo durante 90 min a 25 °C hasta que se paró mediante la adición del inhibidor de proteasa 100  $\mu$ M E-64 (*Sigma*). Los productos de la digestión se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (al 12,5% de acrilamida).

### 3.6 Microscopía electrónica

La reconstrucción tridimensional de los complejos se llevó a cabo mediante la técnica del análisis de partículas individuales mediante microscopía electrónica de transmisión, para ello se siguieron los siguientes métodos.

#### 3.6.1 Preparación de muestras

Para la preparación de las muestras se aplicaron 10  $\mu$ l del complejo DnaK:GrpE purificado por filtración en gel a una concentración variable del orden de  $10^{-2}$   $\mu$ M a rejillas de Cu/Rh con una malla de 400 aberturas/pulgada (*Gilder*) con una capa de carbón volatilizado a las que previamente se les había aplicado una descarga iónica de 15 segundos. La descarga iónica permite obtener una superficie hidrofílica que favorece la adsorción de las proteínas. La muestra permaneció en contacto con la rejilla durante 2 minutos, e inmediatamente se lavó con el tampón de interacción. A continuación, con el fin de teñir la muestra con una sal de un metal pesado al actuar como agente contrastante, se aplicaron 5  $\mu$ l acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 1 minuto y justo después se volvió a lavar con tampón de interacción.

#### 3.6.2 Adquisición de imágenes

Las rejillas se visualizaron en un microscopio electrónico *JEOL 1200EX-II* con un voltaje de 100 kV. Las micrografías electrónicas se obtuvieron bajo condiciones de mínima dosis ( $\sim 10$  e-/Å<sup>2</sup>) y se tomaron fotografías a 0 y 25° de inclinación con un aumento nominal de 50000 aumentos en películas *Kodak SO-163*.

### 3.6.3 Digitalización y procesamiento digital de imágenes

Las micrografías se digitalizaron con un escáner *Zeiss SCAI/Intergraph* con un intervalo de muestreo de 7  $\mu\text{m}/\text{píxel}$  en formato de 8 bits. En este punto se realizó una estimación y corrección de la función de transferencia de contraste (CTF, *contrast transfer function*) empleando el programa *CTFfind3* (Mindell y Grigorieff, 2003). Por otro lado, aquellas micrografías que presentaban un ligero desplazamiento de imagen o astigmatismo se desecharon. Las micrografías se submuestrearon con un factor de 2 para reducir los tiempos de computación, resultando en un muestreo final de 2.8  $\text{\AA}/\text{píxel}$ . Los complejos individuales se seleccionaron manualmente utilizando el paquete informático *XMIPP* (Marabini *et al.*, 1996; Sorzano *et al.*, 2004; Scheres *et al.*, 2008; Sorzano *et al.*, 2010), y se acumularon un total de 30092 partículas. Cada partícula se extrajo en ventanas de 80 x 80 píxeles aplicándose una normalización del nivel de grises utilizando el fondo de las partículas a una media de 0 y una desviación estándar de 1.

### 3.6.4 Clasificación bidimensional de partículas

Para el procesamiento de imagen se utilizaron los paquetes informáticos *EMAN* (Ludtke *et al.*, 1999) y *XMIPP* (Marabini *et al.*, 1996; Sorzano *et al.*, 2004; Scheres *et al.*, 2008; Sorzano *et al.*, 2010). En el inicio del procesamiento las partículas se alinearon y clasificaron en diferentes clases promedio de acuerdo a su semejanza. Para ello se utilizaron los programas *ML2D*, *MLF2D* y *CL2D* pertenecientes al paquete *XMIPP*. El *ML2D* consiste en una clasificación y alineamiento bidimensional de las imágenes mediante algoritmos de máxima verosimilitud (*Maximum-Likelihood*). En el caso del *MLF2D* el planteamiento es similar pero aplicando filtros en el espacio de Fourier y de esta manera resolviendo algunos problemas asociados a la baja relación señal/ruido de las imágenes. El *CL2D* resuelve el mismo problema que los dos anteriores pero desde una perspectiva diferente al subdividir la colección de imágenes un número elevado de clases y de esta manera permitiendo obtener clases más homogéneas desde el inicio del procesamiento. Como control se realizaron clasificaciones con el programa *refine2d* del paquete *EMAN*. A continuación se comprobó la homogeneidad de las partículas para cada una de las clases obtenidas por medio de otro método de clasificación del paquete *XMIPP* llamado *KerDenSOM* (*Kernel density self organizing map*), basado en un sistema de clasificación de mapas autoorganizativos (Kohonen, 1990; Pascual-Montano *et al.*, 2001, Sorzano *et al.*, 2010). Este método de clasificación se basa en algoritmos que funcionan a modo de red neuronal. La complejidad del conjunto inicial de datos se reduce y se obtienen una matriz bidimensional de vectores que condensan la variabilidad presente en la muestra. Los vectores que se disponen más próximos en la matriz son más parecidos entre sí que los que se sitúan más

alejados. Este tipo de clasificación, a diferencia de las anteriores, se lleva a cabo sin asumir de antemano un número determinado de clases presentes en los datos iniciales.

### 3.6.5 Reconstrucción tridimensional de los complejos DnaK:GrpE

Para la reconstrucción tridimensional se seleccionaron las mejores partículas de acuerdo con los resultados de las clasificaciones bidimensionales. El refinamiento del modelo se llevó a cabo con el paquete informático *EMAN* (Ludtke *et al.*, 1999). Como modelos iniciales para dicho refinamiento se utilizaron:

- Una reconstrucción tridimensional previa a partir de las proyecciones más representativas obtenida a partir de líneas comunes.
- La estructura cristalográfica del complejo incompleto, correspondiente al PDB 1dkg publicada por Harrison *et al.*, 1997, y filtrada a 50 Å de resolución con el programa de *Xmipp pdb2mrc*.
- Un esferoide generado con el programa *makeinitialmodel.py* de *EMAN*.
- Ruido generado de manera aleatoria con el programa *makeinitialmodel.py* de *EMAN*.

En las etapas iniciales de refinamiento se utilizó el programa *refine* de *EMAN*, que mediante procesos de refinamiento angular iterativo dio lugar a estructuras similares en cada uno de los controles utilizados como modelos iniciales. En las últimas fases de refinamiento se combinó este programa de *EMAN* con el *ML3D* y *projection matching* de *XMIPP*. El procesamiento concluyó cuando las diferencias entre los volúmenes eran mínimas y consistentes con la información estructural previa.

Para el cálculo de la resolución de la estructura obtenida, la población de partículas asignadas a cada una de las clases de la última iteración del refinamiento se dividió en dos grupos de forma aleatoria. Con esta división se generaron dos volúmenes independientes determinando el grado de similitud entre ellos mediante la correlación en función de la frecuencia espacial. Para la estimación de la resolución se consideraron los valores de corte a 0,3 y 0,5 como coeficiente de correlación en el espacio de Fourier o *Fourier Shell Correlation (FSC)*.

Para la visualización de las estructuras atómicas y de los volúmenes obtenidos a partir de mapas de densidades electrónicas se utilizó el programa *UCSF Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004).

### 3.6.6 Ajuste de las estructuras atómicas al volumen tridimensional de los complejos DnaK:GrpE

El ajuste de la estructura atómica correspondiente al PDB 1dkg descrito en Harrison *et al.*, 1997, dentro de la reconstrucción tridimensional obtenida, se hizo siguiendo los siguientes pasos:

- Cambio de formato del archivo correspondiente al volumen mediante el programa *Bsoft* desarrollado por Heymann y Belnap en 2007.
- Ajuste automático del PDB en el volumen utilizando el programa *ADP\_EM* (Garzón et al. 2007). Para ello se utilizó la orientación del PDB con el mayor coeficiente de correlación tendiendo el mismo un valor del 0,998.
- Ajuste final de forma manual de las estructuras atómicas divididas por dominios utilizando los datos obtenidos en el paso anterior.



# Resultados



### 4.1 Purificación de proteínas

La purificación de las proteínas utilizadas en esta tesis se realizó siguiendo un protocolo de rutina puesto a punto en el laboratorio del Profesor Arturo Muga, en la Unidad de Biofísica de la Universidad del País Vasco. Todas las proteínas se purificaron en *E. coli*.

#### 4.1.1 Purificación de DnaK, DnaK<sub>R151A</sub> y de DnaK<sub>NBD</sub>

Además de DnaK, también se purificó el dominio de unión a nucleótido de la misma (DnaK<sub>NBD</sub>), así como, un mutante sin función alostérica (DnaK<sub>R151A</sub>). La purificación de DnaK, común en los tres casos, se basa en sucesivas etapas de purificación mediante distintos tipos de cromatografías detalladas en el apartado de Materiales y Métodos. Cabe destacar como una de las etapas importantes de la purificación el uso de una columna de ATP-agarosa que permite aislar a DnaK gracias a su actividad ATPásica en el dominio de unión a nucleótido (NBD). Se procedió a la dialización de las muestras finales con el fin de eliminar cualquier nucleótido unido al NBD que podría influir en los estudios biofísicos y bioquímicos posteriores. Se demostró que el nucleótido había sido adecuadamente eliminado al obtenerse valores  $A_{280}/A_{260}$  inferiores o iguales a 0,7. La absorbancia del ADP o ATP disminuye de manera drástica a partir de los 280nm, es por ello que los valores más cercanos a 1 aseguran casi la total ausencia de nucleótido.

Los ensayos de actividad ATPásica dan información de la capacidad de una proteína para hidrolizar ATP. DnaK tiene una actividad ATPásica muy débil pero perfectamente detectable mediante esta técnica. Las medidas de actividad ATPásica muestran que todos los mutantes de DnaK utilizadas en esta tesis tienen su actividad ATPásica intacta.

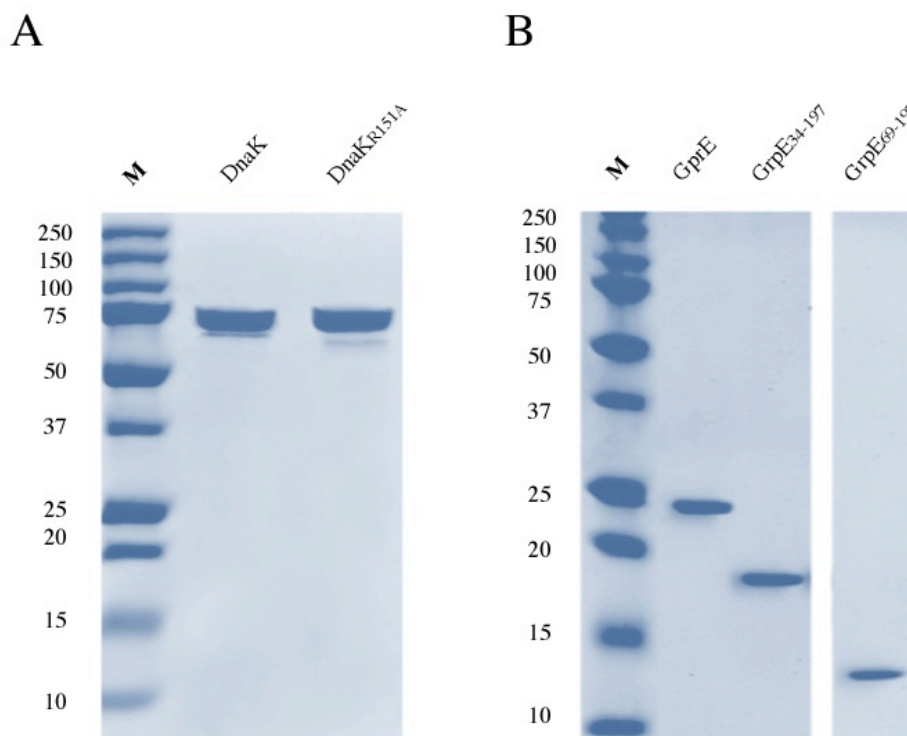
#### 4.1.2 Purificación de GrpE y sus diferentes variantes

Al igual que en DnaK, la purificación de estas proteínas se basa en la utilización de diferentes pasos de cromatografía. Como diferencia, cabe destacar un paso previo de precipitación con sulfato amónico al 60% (p/v), al que suceden a dos pasos de cromatografía, un primero de intercambio iónico y un segundo de afinidad.

Se ha demostrado que los 33 primeros residuos amino-terminales de GrpE son muy importantes para su función (Moro *et al.*, 2007). Es por ello que se creó una versión trucada de ella, GrpE<sub>34-197</sub>. GrpE en su versión completa es susceptible de ser degradada justo en estos aminoácidos por

varias enzimas proteolíticas, entre ellas la papaína, una cisteín-proteasa. A estas dos formas de GrpE se añadió una tercera también truncada, GrpE<sub>69-197</sub> pero en este caso se obtuvo directamente a partir de un mutante de eliminación. El método utilizado para su purificación coincide con el de la GrpE silvestre.

Los análisis en SDS-PAGE mostrados en la **Figura 4.1** revelan que todas las proteínas están purificadas a homogeneidad.

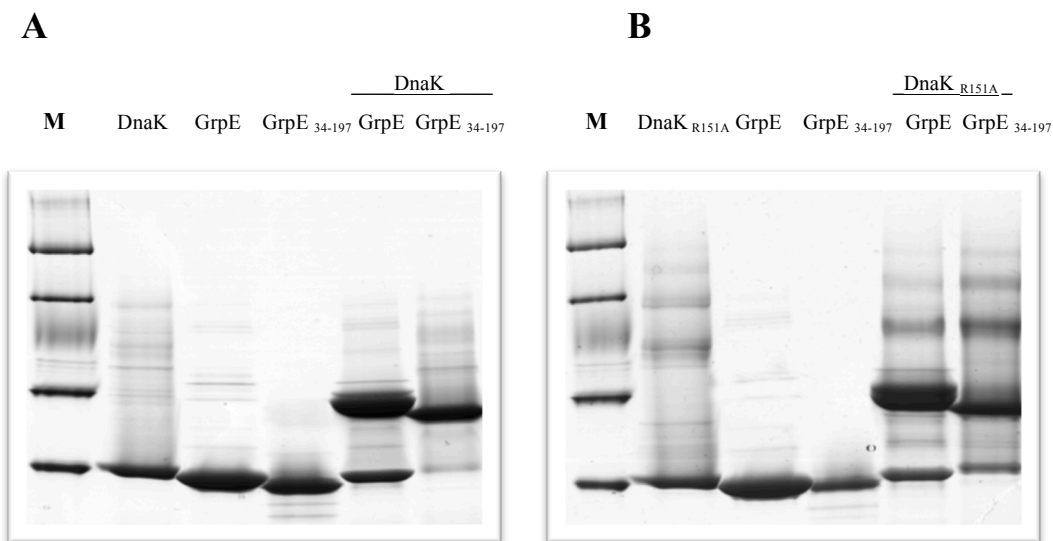


**Figura 4.1: Proteínas purificadas.** **A.** Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con la proteína DnaK y el mutante alostérico DnaK<sub>R151A</sub>. **B.** Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con GrpE, GrpE<sub>34-197</sub> y GrpE<sub>69-197</sub>.

### 4.2 Ensayo de interacción mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas

Estos ensayos se realizaron para comprobar que las proteínas son capaces de interaccionar entre ellas y formar complejos estables, así como para conocer el grado de afinidad de la interacción como paso previo a los estudios cinéticos. Los experimentos se realizaron en condiciones equimolares y en presencia de ADP. En la **Figura 4.2** se muestran dos geles en condiciones nativas que describen los ensayos realizados. **A** y **B** pertenecen a los experimentos realizados con DnaK silvestre y DnaK<sub>R151A</sub>, respectivamente. En ambos casos se observan bandas de retardo a la altura del tercer marcador en las calles correspondientes a las interacciones. De esta

manera, se comprueba que los dos tipos de DnaK son capaces de interactuar con gran afinidad y de manera estable con cada una de las GrpE.



**Figura 4.2: Ensayos de interacción en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. A.** Conjunto de ensayos utilizando DnaK salvaje. **B.** Interacciones realizadas con el mutante alostérico DnaK<sub>R151A</sub>.

En las calles en las cuales hay presencia de DnaK se pueden apreciar bandas de mayor retardo por encima de la propia proteína o de los complejos formados que dada la pureza de la muestra son atribuibles a autoasociaciones de DnaK que serán explicadas con detalle en el apartado de la Discusión. Se aprecia una mayor proporción de bandas con más retardo en los geles correspondientes a los ensayos en los que se utilizó DnaK<sub>R151A</sub>, lo que tiene sentido puesto que el mutante alostérico es indiferente a la adición de ADP presente en la incubación. El ADP además de ser imprescindible para la interacción de DnaK con GrpE, reduce considerablemente la capacidad de DnaK para autoasociarse. Hay que tener en cuenta que a pesar de añadir ADP a todas las proteínas el tampón de corrida de la electroforesis no lo lleva y el nucleótido termina diluyéndose a lo largo del ensayo. Esto podría explicar por qué también aparecen bandas con retardo en los carriles de DnaK silvestre.

### 4.3 Cinéticas de unión a sustrato

Para comprender el mecanismo de interacción entre DnaK y GrpE se estudió al sistema en presencia de un sustrato. El péptido  $\alpha$ -N,dansyl-NRLLLTG (dNR), es un sustrato de elevada afinidad para DnaK y el dansilo acoplado al péptido aumenta su emisión de fluorescencia al interactuar con ella. Se utilizaron los tres tipos de GrpE purificados, que al tener partes truncadas pueden ofrecer información de la importancia de cada una de las regiones ausentes. Las gráficas de la **Figura 4.3** representan el incremento de fluorescencia producido al añadir dNR a complejos estables de DnaK:GrpE en presencia de ADP. En general hay un aumento

de fluorescencia que se corresponde con la unión de dNR al complejo de chaperonas. El análisis de las diferencias de las constantes de unión entre los diferentes tipos de mutantes de GrpE y DnaK es fundamental para caracterizar de qué manera el intercambiador de nucleótidos regula el ciclo funcional de DnaK.

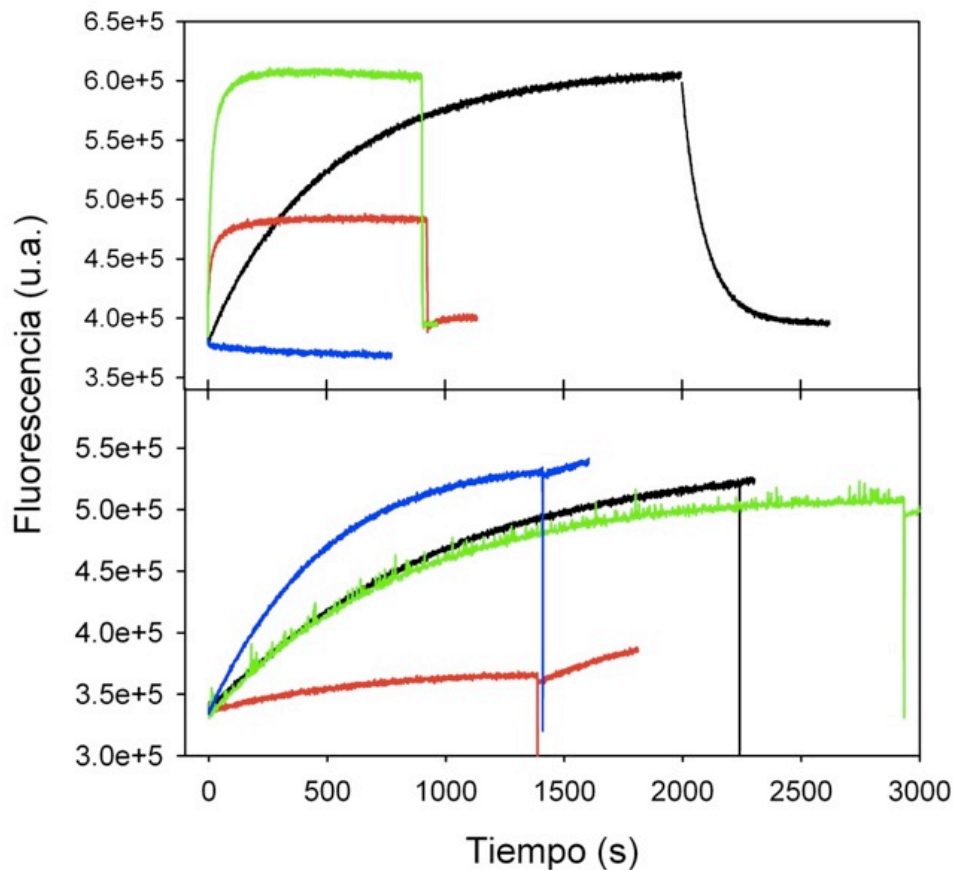
En la parte superior de la **Figura 4.3** se muestran los espectros de emisión de los ensayos realizados con DnaK silvestre. La unión de GrpE y GrpE<sub>34-197</sub> a DnaK se ve reflejada en cinéticas de unión de sustrato muy rápidas en comparación al control con DnaK. En el caso de GrpE<sub>69-197</sub>, en cambio, su interacción con DnaK parece inhibir la unión de sustrato. Existen diferencias en cuanto al nivel de unión de sustrato entre GrpE y GrpE<sub>34-197</sub>; en el caso de esta última existe menor cantidad de sustrato unido en la fase estacionaria. Como control se añadió ATP en el punto en el que las cinéticas se aproximaban al estado estacionario para confirmar que ciertamente había sustrato unido. La adición de ATP provoca un descenso en emisión fluorescencia instantáneo que se traduce como liberación de dNR. Exceptuando el caso de GrpE<sub>69-197</sub>, la unión de GrpE a DnaK también se traduce en cinéticas de liberación de sustrato más rápidas. Los valores correspondientes a las constantes de unión reflejados en la **Tabla III** reflejan valores muy elevados de unión cuando no están presentes los 33 primeros aminoácidos de GrpE.

**Tabla III: Constantes de unión aparentes**

	$K_{off} \times 10^3 (s^{-1})$	
	<b>DnaK</b>	<b>DnaK<sub>R151A</sub></b>
-	$1.9 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.1$
<b>GrpE</b>	$28.5 \pm 0.7$	$1.5 \pm 0.1$
<b>GrpE<sub>34-197</sub></b>	$42.2 \pm 0.9$	$1.2 \pm 0.1$
<b>GrpE<sub>69-197</sub></b>	-	$2.4 \pm 0.3$

La parte inferior de la **Figura 4.3** muestra las cinéticas realizadas para DnaK<sub>R151A</sub>, el mutante de DnaK con la función alostérica inhibida. En este caso las cinéticas son más lentas y muy similares entre ellas exceptuando para la DnaK unida a GrpE<sub>34-197</sub>, que presenta uniones de sustrato considerablemente más lentas. Para DnaK unida a GrpE<sub>69-197</sub> la cantidad de sustrato total unido es mayor al resto. En este caso la adición de ATP como control no provoca liberación de sustrato, sino que incluso favorece la unión del mismo. Los valores de constantes de unión (**Tabla III**) para los experimentos con DnaK mutante se reducen casi un orden de magnitud dando valores cercanos a los de DnaK sin intercambiador. Los valores obtenidos para la interacción con GrpE silvestre son del mismo rango que para DnaK sola o con GrpE<sub>34-197</sub>, es

decir que aunque se está uniendo menos sustrato, el que se une lo hace con la misma afinidad. Cuando DnaK se encuentra acomplejada al mutante GrpE<sub>69-197</sub> la constante de afinidad se duplica, es decir, se une más sustrato y con mayor afinidad.



**Figura 4.3: Cinéticas de unión del péptido dNR (dansyl-NRLLLTG) a DnaK y DnaK<sub>R151A</sub> en presencia de GrpE y sus mutantes de eliminación.** A. DnaK (1 mM) se incubó 10 minutos a 25 °C con GrpE (4 mM) (rojo), y los mutantes GrpE<sub>34-197</sub> (verde) y GrpE<sub>69-197</sub> (azul) a la misma concentración, en presencia de ADP (0.5 mM). El péptido fluorescente dNR (1 mM) se añadió sobre los complejos preformados y se registro la unión siguiendo el aumento de fluorescencia. Como control se registró la unión a DnaK (línea negra). B. los complejos con DnaK<sub>R151A</sub> se formaron como en A, y se registró la unión de dNR.

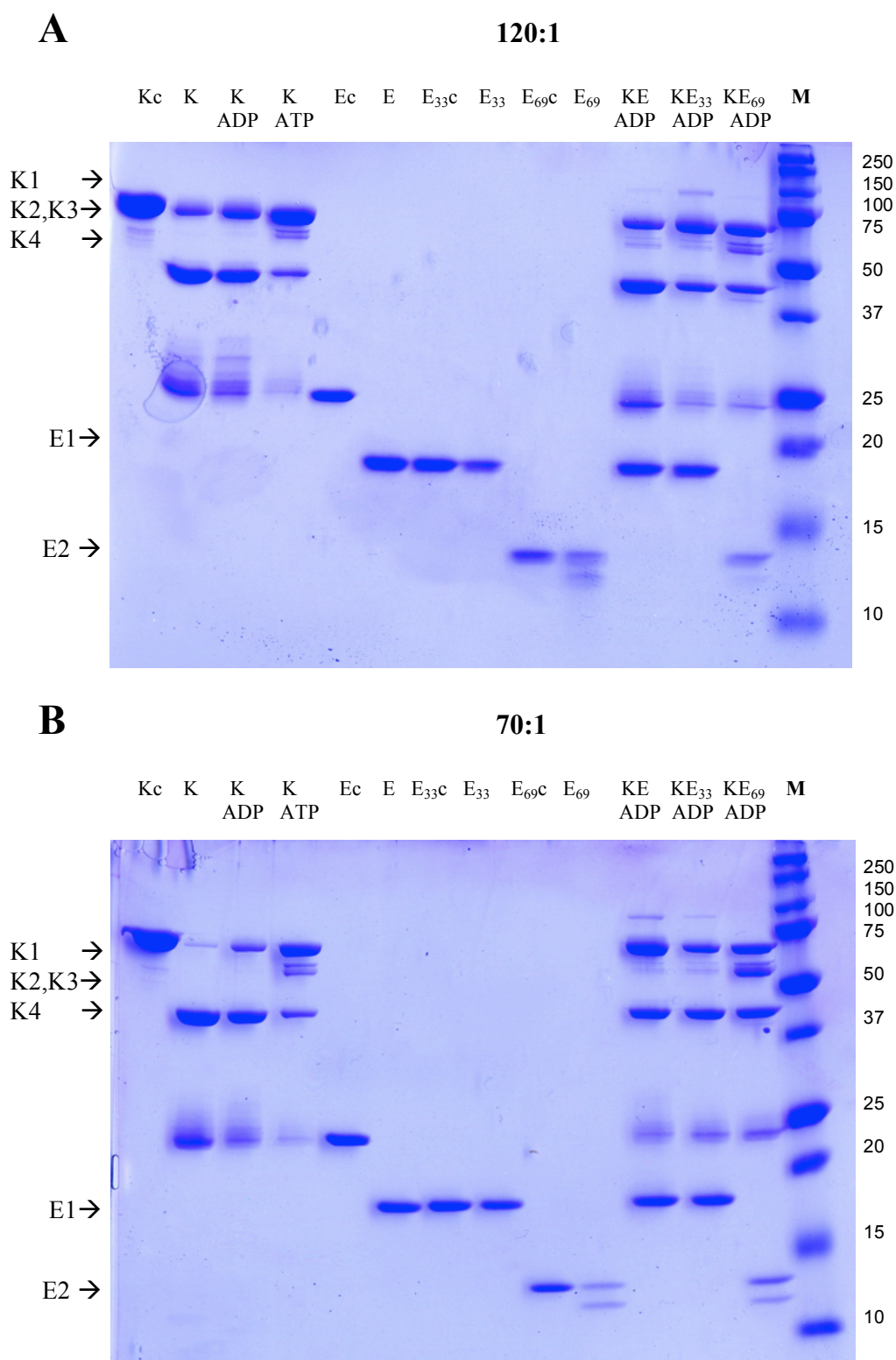
#### 4.4 Experimentos de proteólisis parcial con papaína

El nivel de accesibilidad de la enzima proteolítica puede dar información indirecta de cómo es la estructura del complejo entre DnaK y GrpE, y esta información debe ser consecuente con los mapas de densidad electrónica que se obtengan mediante microscopia electrónica.

En la **Figura 4.4** aparecen dos geles de electroforesis de que muestran los fragmentos de proteólisis parcial obtenidos tras incubar cada una de las muestras con la enzima a una relación molar 120:1 y 70:1 (proteína:papaína) respectivamente para **A** y **B**. En todas los carriles del gel se añadió la misma cantidad de proteína por lo que es posible comparar el grado de digestión entre controles no digeridos y muestras con papaína. Los primeros carriles se corresponden con DnaK silvestre y tres digestiones de ella misma en ausencia de nucleótido, y en presencia de ADP y de ATP. Queda patente, sobre todo en el gel de la **Figura 4.4B** que la presencia o ausencia de cada nucleótido tiene efecto sobre el nivel de accesibilidad de la enzima por DnaK y que el sitio preferido de digestión es el lazo que une ambos dominios. En ausencia de nucleótido, DnaK se digiere casi por completo por el lazo de unión dando lugar a una banda mayoritaria de un tamaño aproximado a 45kDa que se corresponde con el NBD de DnaK, asimismo, también aparecen bandas de digestión de entre 25 y 30 kDa que pertenecen a distintos fragmentos del SBD. En presencia de ADP el nivel de protección es mucho mayor, pero es cuando se incuba con ATP cuando el nivel de protección es máximo. En presencia de ATP, DnaK se ve bastante protegida en la región del lazo de unión. Los controles de digestión para cada una de las GrpE revelan la proteólisis de GrpE a nivel de sus 33 residuos amino-terminales como era de esperar, de la misma manera que GrpE<sub>34-197</sub> permanece intacta al ataque proteolítico. Únicamente el mutante GrpE<sub>69-197</sub> es parcialmente sensible a la proteólisis siendo digerido en el aminoácido 78 tal y como se representa esquemáticamente en la **Figura 4.5**. Cuando la papaína actúa sobre los complejos de DnaK y GrpE salvajes ya formados, se observan diferencias a la hora del ataque proteolítico cuando la proporción de papaína es menor (**Figura 4.4A**). En la misma calle del gel aparece una banda a la altura de GrpE que debería haber sido degradada tal y como sucede en el control de GrpE bajo las mismas condiciones. Dicha banda podría ser asimismo asignada a fragmentos de digestión de DnaK, que también aparecen a la misma altura pero al aumentar la concentración de papaína (**Figura 4.4B**) la intensidad de la banda disminuye considerablemente mientras que si fueran únicamente de DnaK la intensidad de la banda incluso se vería aumentada. De esta manera se puede decir que la presencia de DnaK protege a los primeros 33 residuos de la región amino-terminal de GrpE del ataque proteolítico de la enzima.

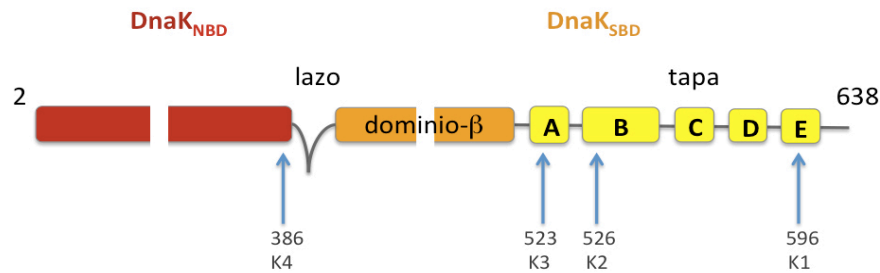
Por otro lado, también se aprecia que en los complejos formados con GrpE<sub>69-197</sub>, DnaK sufre un ataque proteolítico similar al que sufre DnaK en presencia de ATP. Tal y como aparece en la **Figura 4.5** que esquematiza los fragmentos sobre la secuencia proteica, en ambos aparecen fragmentos proteolíticos que coinciden con formas digeridas K2 y K3 mientras que el lazo de unión queda bastante protegido. En la interacción de GrpE<sub>69-197</sub> con DnaK también se observa cierta protección de GrpE a la altura del aminoácido 78, muy patente en la **Figura 4.4A**.



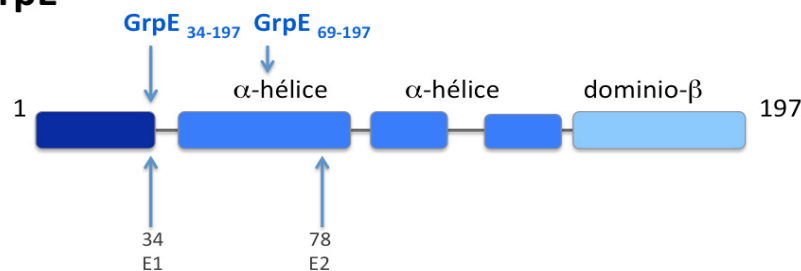


**Figura 4.4: Proteólisis parcial con papaína de los complejos formados por DnaK con GrpE y sus variantes.** Los geles de electroforesis SDS-PAGE muestran los fragmentos proteolíticos como resultado de diferentes concentraciones de papaína. En **A** para una relación molar de 120:1 y en **B** de 70:1 papaína:proteína.

## DnaK

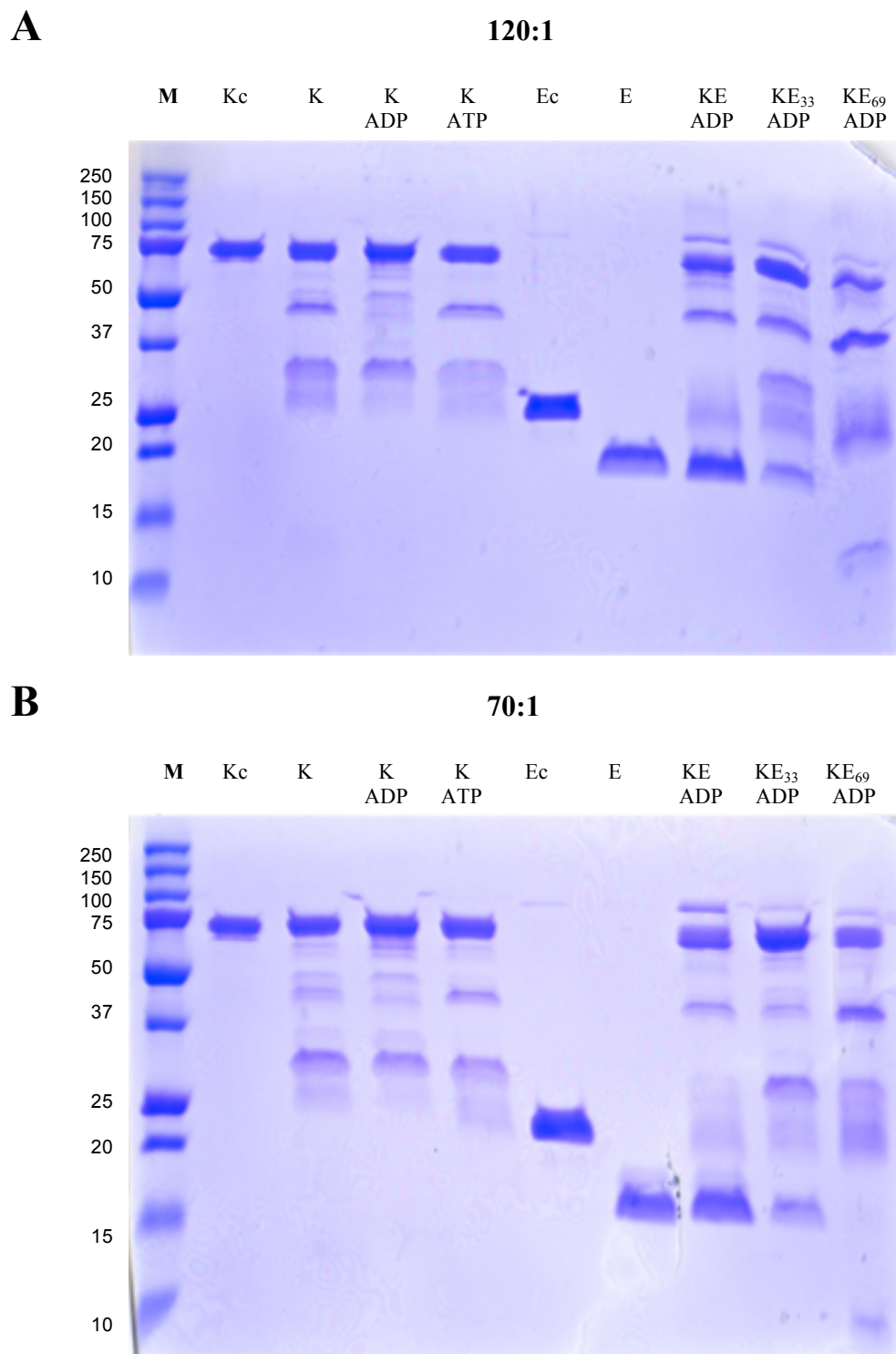


## GrpE



**Figura 4.5: Resumen a modo de esquema de la distribución de los dominios de cada proteína y los fragmentos mayoritarios de digestión proteolítica por papaína.** Estos fragmentos fueron identificados por Espectrometría de Masas. Esquemas correspondiente a DnaK (A.) y a GrpE (B.). Extraído de Moro *et al* en 2007.

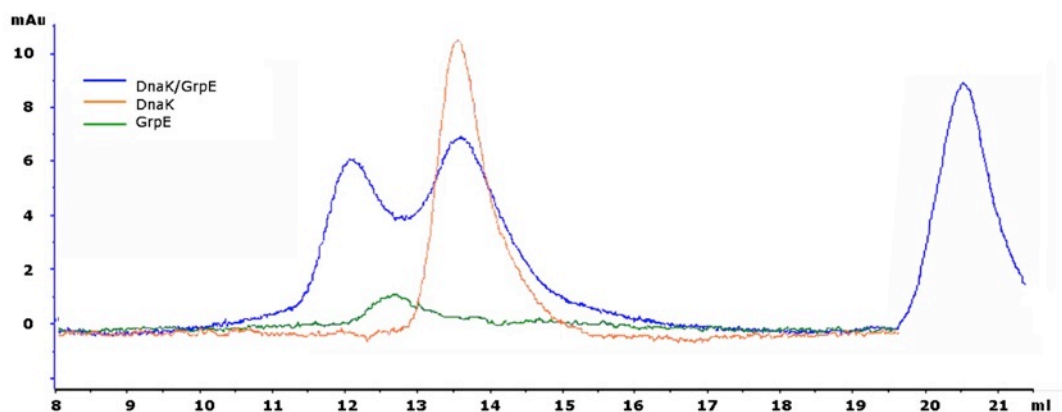
En la **Figura 4.6** se muestra el mismo tipo de experimento de proteólisis, pero utilizando en este caso el mutante alostérico DnaK<sub>R151A</sub> y omitiendo los controles para las GrpEs. Se observan diferencias fundamentales en las digestiones de DnaK en función de la ausencia y presencia de nucleótidos. El mutante alostérico en sí mismo no presenta apenas variación en el patrón de proteólisis, es capaz de resistir considerablemente a la acción de la enzima con una pauta similar a la que se mostraba con la DnaK silvestre en presencia de ATP del experimento anterior. Sabiendo que DnaK en presencia de ATP presenta una conformación bastante compacta que protege al lazo de unión entre dominios, se puede extrapolar que el mutante de DnaK alostérico mantiene una estructura muy parecida en la que el lazo no se encuentra accesible a la actividad proteolítica de la enzima. Analizando los fragmentos de digestión correspondientes a la interacción de DnaK<sub>R151A</sub> con GrpE<sub>69-197</sub> destaca un incremento en la digestión de DnaK a nivel del lazo de unión que no se produce en ninguno de los carriles, ni siquiera en los controles de DnaK<sub>R151A</sub> que será debatido en el apartado de la **Discusión**.



**Figura 4.6: Proteólisis parcial con papaína del mutante alostérico DnaK<sub>R151A</sub> con GrpE y sus variantes.** Los geles de electroforesis SDS-PAGE muestran los fragmentos proteolíticos como resultado de diferentes concentraciones de papaína. En **A** para una relación molar de 120:1 y en **B** de 70:1 papaína:proteína.

### 4.5 Caracterización de la formación de complejos DnaK:GrpE por cromatografía de filtración en gel

Otra aproximación para caracterizar la unión del complejo entre DnaK y GrpE y dar una idea de su estequiometría es la de utilizar cromatografía de filtración en gel. Los complejos se incubaron en una relación molar 2:1 (DnaK:dímero de GrpE) para asegurar que la mayoría de GrpE se encontrase unida a DnaK. En la **Figura 4.7** se muestra el perfil cromatográfico de DnaK (naranja), de GrpE (verde) y el de la incubación de GrpE con DnaK (azul). En todos los ensayos se inyectó en la columna la misma cantidad molar de proteína que la citada para la interacción. Destaca en el perfil de GrpE (verde) la baja absorbancia que presenta, debido a que esta proteína no tiene residuos de triptófano en su secuencia y tan sólo una tirosina, aminoácidos que a 280nm son los responsables de la absorbancia. También llama la atención que GrpE, un dímero de 44kDa, eluya antes que DnaK, cuya masa molecular es de unos 75 kDa. Esto es debido a que GrpE tiene una estructura alargada que hace que su movilidad sea como la de una proteína de un tamaño mayor. Para el perfil cromatográfico de DnaK junto a GrpE se observan dos picos mayoritarios (exceptuando el de los 20 ml de elución que pertenece al ADP no unido), el primero corresponde al complejo y el segundo solapa con DnaK libre. Ambos picos presentan una absorbancia similar confirmando una estequiometría 1:1 DnaK:dímero de GrpE.

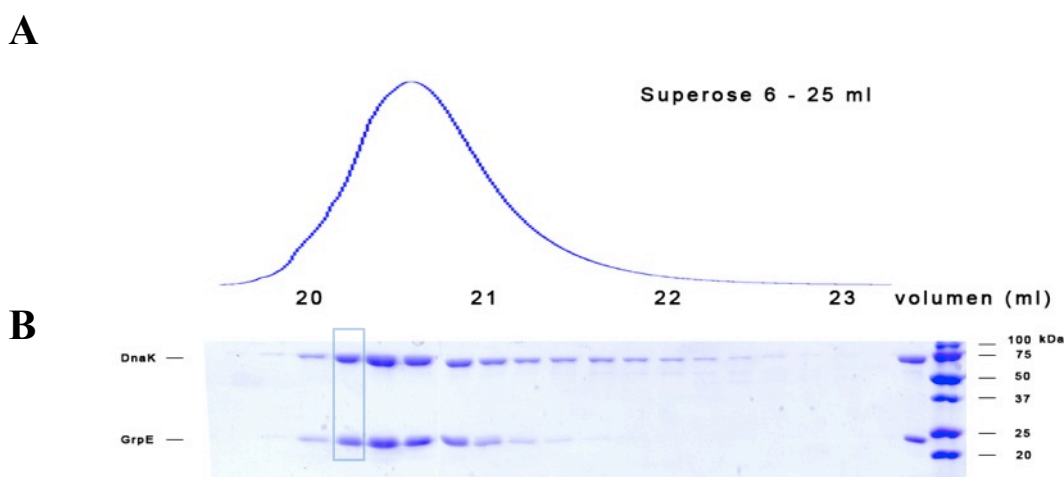


**Figura 4.7: Cromatografía de filtración en gel de los complejos DnaK:GrpE.** La cromatografía se realizó en una Superdex 200 (*GE Healthcare*) con una concentración final de 20μM por monómero de DnaK y GrpE. Se muestran los perfiles cromatográficos de DnaK (naranja), GrpE (verde) y la incubación de DnaK:GrpE (azul).

### 4.6 Purificación del complejo DnaK:GrpE

Para resolver la estructura tridimensional del complejo DnaK:GrpE por microscopía electrónica se procedió a purificar el complejo por cromatografía de filtración en gel, de la misma manera que en el apartado anterior. En este caso, las proteínas se incubaron en relación equimolar

DnaK:GrpE (dímero). Se tomaron muestras de las fracciones eluidas que se cargaron en un gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes, donde se pudo comprobar (**Figura 4.8**) que el pico principal contenía ambas proteínas y que toda la proteína DnaK se había unido a GrpE al no apreciarse un segundo pico retrasado. En el gel de electroforesis aparece marcada la fracción que se usó para la microscopía electrónica. Se recogió esta fracción y no la del pico de más absorbancia debido a que en ese volumen de elución y según los resultados del apartado anterior podría haber parte de GrpE libre.



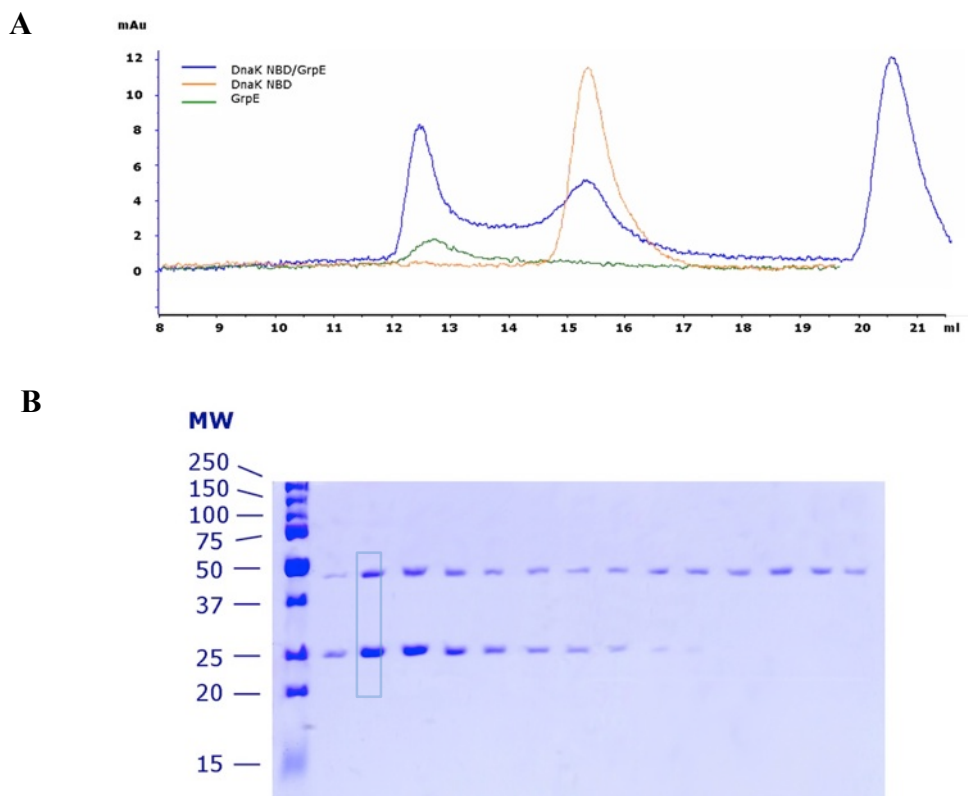
**Figura 4.8: Purificación del complejo DnaK:GrpE por cromatografía de filtración en gel. A.** Perfil cromatográfico de elución del complejo. La cromatografía se realizó en una Superosa 6 (*GE Healthcare*) con una concentración final de 20  $\mu$ M por monómero de DnaK y dímero de GrpE. En la parte superior de la imagen se muestra el perfil cromatográfico de elución del complejo. **B.** Gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes a partir de las fracciones eluidas. Se recuadra en azul la fracción utilizada para la microscopía electrónica.

### 4.7 Purificación del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE

Una vez obtenido un mapa de densidad electrónica del complejo DnaK:GrpE, y con el fin de comprobar lo correcto del procesamiento, se decidió reconstruir tridimensionalmente mediante microscopía electrónica, el complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE cuya estructura había sido ya resuelta a resolución atómica por Harrison et al. en 1997.

Esta vez, para su purificación, las proteínas fueron incubadas en una relación molar 3:1 DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE, para asegurar que la mayoría de GrpE se encuentre unida a DnaK. En la **Figura 4.9** se muestra el perfil cromatográfico de DnaK<sub>NBD</sub> (naranja), el de GrpE (verde) y el de la incubación de GrpE con DnaK (azul). En todos los ensayos se inyectó en la columna la misma cantidad molar de proteína que la citada para la interacción. De la misma manera, para el perfil cromatográfico de DnaK<sub>NBD</sub> junto a GrpE se observan dos picos mayoritarios (exceptuando el de los 20 ml de elución que pertenece al ADP no unido), el primero corresponde al complejo

que solapa con el pico de elución de GrpE y el segundo solapa con DnaK NBD libre. Ambos picos presentan una absorbancia compatible con una estequiometría 1:1 DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE (dímero).



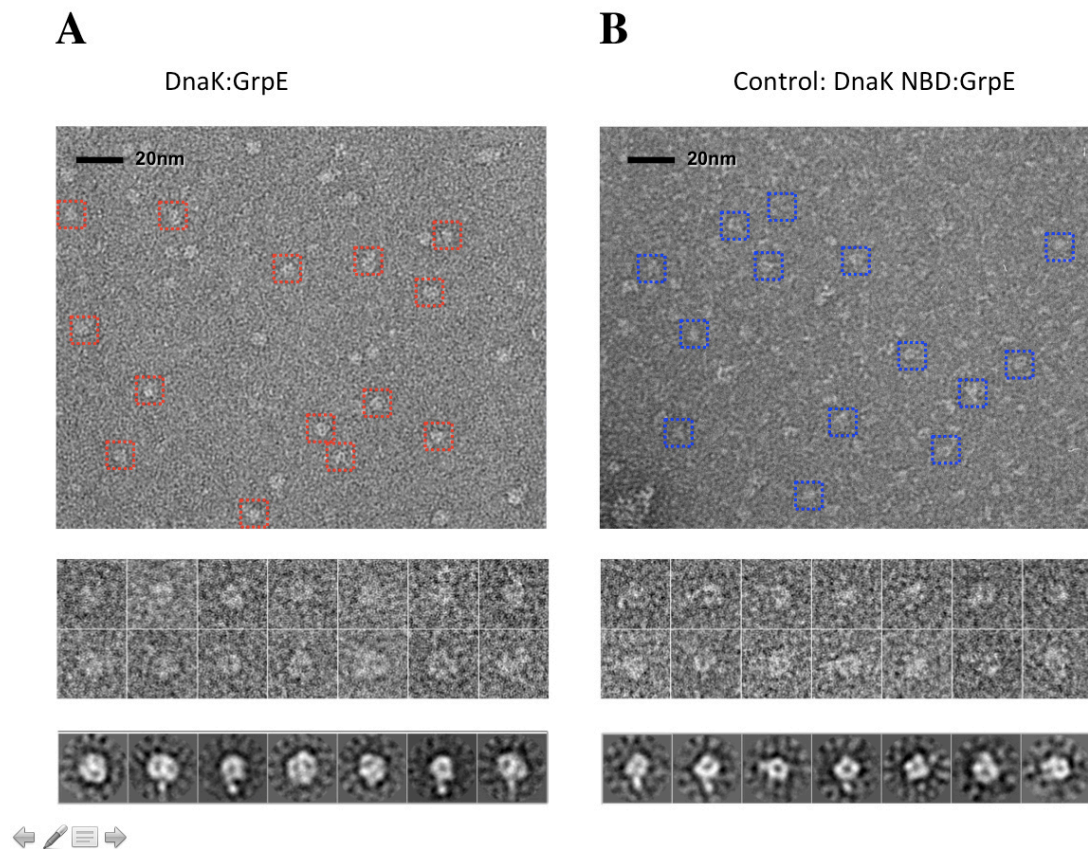
**Figura 4.9: Purificación del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE por cromatografía de filtración en gel. A.** Perfiles cromatográficos de DnaK (naranja), GrpE (verde) y la incubación de DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE (azul). La cromatografía se realizó con una resina Superosa 12 (*GE Healthcare*) con una concentración final de 30 μM por monómero de DnaK<sub>NBD</sub> y 20 μM dímero de GrpE. **B.** Gel de electroforesis en condiciones desnaturalizantes a partir de las fracciones eluidas. Se recuadra en azul la fracción utilizada para la microscopía electrónica.

### 4.8 Reconstrucción tridimensional del complejo DnaK:GrpE por Microscopía Electrónica

Como se ha descrito previamente en la **Introducción**, hasta la fecha sólo han sido resueltas tres estructuras atómicas de GrpE y cada una de ellas de especies diferentes. De las tres, sólo una de ellas de *Escherichia coli* y no es de la molécula. La estructura de DnaK, y en particular la de los dominios DnaK<sub>NBD</sub> y DnaK<sub>SBD</sub> por separado, ha sido determinada por multitud de grupos. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de esos grupos, hasta el momento no ha sido posible resolver la estructura completa del complejo DnaK:GrpE, y sólo se ha obtenido la del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE. Con el fin de determinar la arquitectura global del complejo DnaK:GrpE (~110 kDa) se llevó a cabo un estudio mediante microscopía electrónica y análisis de partículas



individuales.



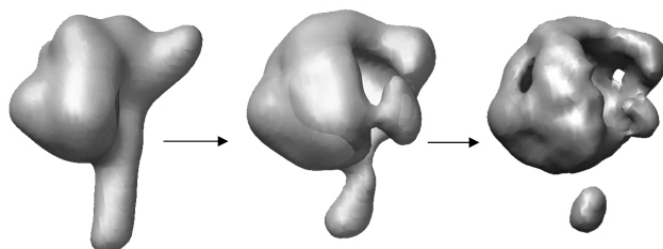
**Figura 4.10: Microscopía electrónica de los complejos DnaK:GrpE.** A. Campo correspondiente a una micrografía tomada de una rejilla de microscopía del complejo DnaK:GrpE teñida con acetato de uranilo. La barra de escala corresponde a 20 nm. Justo debajo una galería de partículas individuales que se corresponden con los complejos fotografiados y ejemplos de imágenes medias de las proyecciones. B. Campo, galería de partículas individuales y medias de las proyecciones correspondientes al complejo formado por GrpE y DnaK<sub>NBD</sub> utilizado como control.

Las alícuotas seleccionadas con los complejos purificados por cromatografía se aplicaron inmediatamente a rejillas de microscopía con el fin de evitar disociaciones de los complejos. Paralelamente, y como control, se analizaron al microscopio siguiendo el mismo protocolo muestras correspondientes al complejo formado por DnaK<sub>NBD</sub> y GrpE (~80 kDa). En la **Figura 4.10** se muestran los pasos iniciales de microscopía de los complejos formados por DnaK:GrpE (**Figura 4.10A**) y DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE (**Figura 4.10B**)

Las muestras presentaron muchos problemas a la hora de ser visualizadas al microscopio electrónico. Algunos de los problemas son debidos a que el complejo no se adhiere bien a la rejilla. Se prepararon rejillas con descarga iónica y sin descarga, y se pudo determinar que las primeras son las que permiten una mejor visualización del complejo. Asimismo, prácticamente todas las rejillas preparadas no alcanzaban un contraste óptimo por el que pudiesen apreciarse

los complejos y utilizarse para el análisis posterior. Otro de los problemas frecuentes era la elevada formación de agregados de diferentes tamaños que podían atribuirse a formas autoasociadas de DnaK que se habían disociado de GrpE. La rapidez en la preparación de las muestras (menos de 3 horas desde su recolección), así como, la presencia de ADP en el tampón de dilución disminuía considerablemente estos agregados. De la misma manera fue necesaria la utilización de tampón de interacción en el buffer de lavado ya que de esta forma la muestra era más homogénea a pesar de tener menos contraste. A pesar de todos los cambios realizados la mayoría de los experimentos no eran reproducibles y fue necesaria la preparación de muchas rejillas. Finalmente se consiguió obtener rejillas en las que los complejos eran fácilmente distinguibles y de tamaño adecuado.

En las micrografías adquiridas se observaron moléculas aparentemente esféricas que según el tamaño podían corresponderse con los complejos GrpE:DnaK (**Figura 4.10A**). Se seleccionaron y extrajeron un total de aproximadamente 30.000 partículas individuales de las micrografías, que fueron procesadas mediante métodos de alineamiento y promediado libres de referencia basados en correlación cruzada y máxima verosimilitud (ver apartado de **Materiales y Métodos**). Al mismo tiempo se seleccionaron en torno a 15.000 partículas para el experimento correspondiente a GrpE y DnaK<sub>NBD</sub>, (**Figura 4.10B**) que fueron procesadas bajo protocolos equivalentes.



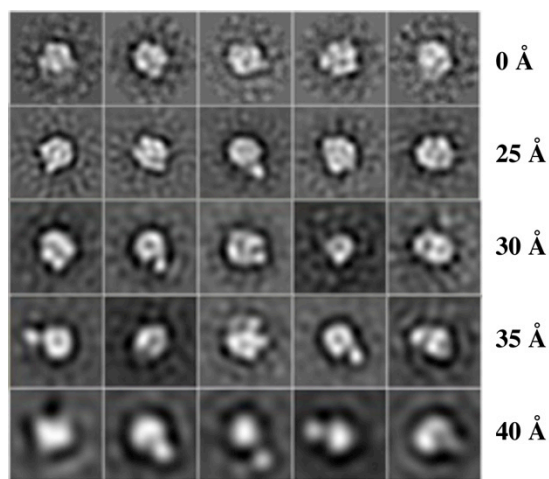
**Figura 4.11: Evolución inicial de los mapas de densidad electrónica correspondientes al complejo de DnaK con GrpE.** Como referencia inicial el primer volumen se corresponde con la estructura cristalográfica de Harrison *et al.*, en 1997, y los dos siguientes volúmenes a la degeneración en las sucesivas rondas de refinamiento.

En las primeras etapas de procesamiento y reconstrucción tridimensional de GrpE :DnaK hubo grandes problemas a la hora de obtener un volumen consistente y fiable. En la **Figura 4.11** se representa la evolución de los mapas de densidad electrónica utilizando como referencia inicial la estructura cristalográfica de Harrison *et al.*, en 1997 y refinando contra una selección de las mejores partículas ( ~22.000) del total de las 30.000. En las sucesivas vueltas de refinamiento, el mapa de densidad electrónica no es consistente y termina degenerando y perdiendo el tallo. El hecho de que en las primeras clasificaciones bidimensionales se obtuvieran medias mayoritariamente esféricas y que los volúmenes obtenidos en las rondas de refinamiento



convergiesen hacia formas globulares hizo plantearse nuevas estrategias de refinamiento para lograr que el esperado “tallo” de GrpE apareciera.

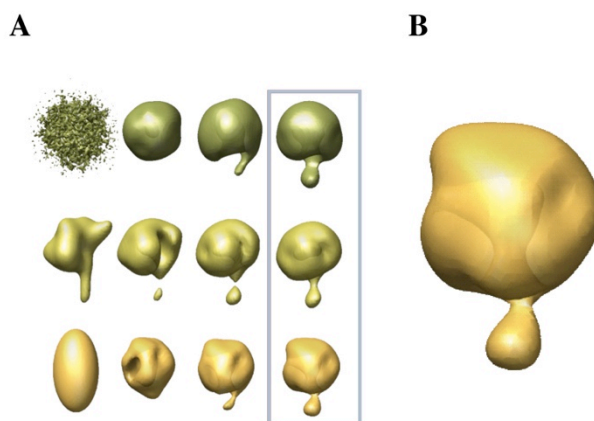
Algunas de las estrategias utilizadas fueron las de utilizar herramientas de clasificación bidimensional que aplicasen filtros en el espacio de Fourier. En la **Figura 4.12** se expone una galería de medidas libres de patrón en las que al aumentar el filtro en Å (Angstrom) la señal/ruido se incrementa. Esto es debido a que al eliminar los detalles de las altas frecuencias con los filtros o máscaras el detalle de baja frecuencia se alinea mejor. De esta forma se pudo observar que muchas medias presentaban un “tallo”. Éste se puede corresponder con el que muestra GrpE, pero debido a que está compuesto tan sólo por sólo dos hélices  $\alpha$  apenas es perceptible debido a la baja relación señal/ruido de las imágenes individuales. Estos métodos de clasificación mostraron unas moléculas más alargadas y que se correspondían casi con total probabilidad a vistas laterales de la proteína en distintas orientaciones rotacionales a lo largo de su eje longitudinal. Estos resultados son mucho más compatibles con la bibliografía que se dispone.



**Figura 4.12: Medias libres de patrón utilizando herramientas de clasificación bidimensional que aplican filtros en el espacio de Fourier.** Galería comparativa de medias aumentando en cada fila el filtro en Å de Fourier. La herramienta para clasificación utilizada fue el ML2D/MLF2D de XMIPP (Pascual-Montano *et al.*, 2001) y aplicando los filtros descritos, se muestran los datos correspondientes a la microscopía de DnaK con GrpE. Según aumenta el filtro (en Å) la señal/ruido se incrementa pudiendo alinear mejor los “tallos” supuestamente correspondientes a GrpE.

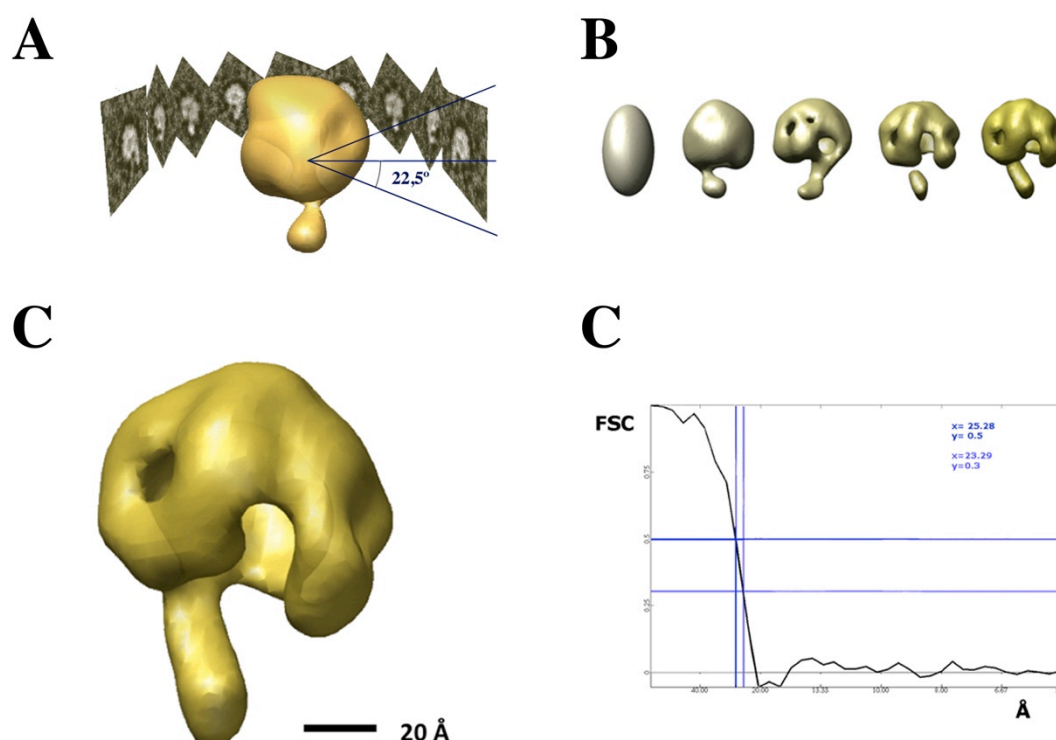
El paso siguiente se fundamentó en una exhaustiva reclasificación de partículas para seleccionar aquellas que presentasen “tallo”. Para ello se recurrieron a las diferentes herramientas del paquete XMIPP, entre ellas *ML2D*, *MLF2D* y *CL2D*. También fueron muy útiles la utilización de mapas autoorganizativos *KerDenSOM* (Kohonen, 1990; Pascual-Montano *et al.*, 2001) que permitieron comprobar los niveles de homogeneidad de cada una de las clases medias libres de referencia. Gracias a estas herramientas se lograron seleccionar un total de 3.700 partículas con tallo.

Para la reconstrucción tridimensional tal y como se detalla en el apartado de Materiales y métodos las partículas seleccionadas fueron enfrentadas a una serie de volúmenes iniciales diferentes entre sí. En la **Figura 4.13A** se detalla el proceso de las primeras etapas de refinamiento con la nueva selección de partículas. En el esquema se aprecia como todas las estructuras convergen a un volumen similar formado por una “cabeza” más o menos esférica y un “tallo” que emerge por la parte inferior. De todos ellos, se seleccionó el que había evolucionado a partir de un esferoide (**Figura 4.13B**).



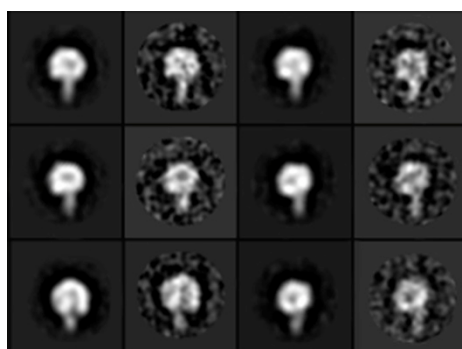
**Figura 4.13. Evolución de las primeras etapas de procesamiento del complejo DnaK:GrpE a partir de diferentes modelos iniciales una vez seleccionadas partículas individuales que presentaban “tallo”.** A. Los modelos iniciales se corresponden con ruido generado de manera aleatoria, la estructura cristalográfica del complejo incompleto, correspondiente al PDB 1dkg publicada por Harrison *et al.*, 1997, y filtrada a 20 Å; y un esferoide respectivamente. B. Modelo obtenido a partir del refinamiento del esferoide que finalmente fue elegido para continuar con las sucesivas etapas de refinamiento.

A partir de este modelo se llevó a cabo un análisis mediante procesos de refinamiento angular iterativo con las partículas seleccionadas, generando así una reconstrucción tridimensional (**Figura 4.14**). Para ello, se utilizaron exclusivamente las vistas con tallo que podrían corresponder a vistas laterales de la molécula. Además de esto, durante el refinamiento se impuso una restricción angular de hasta 22.5° desde el ecuador formando un ángulo total de 45° de restricción, tal y como se esquematiza en la **Figura 4.14A**. De esta forma se evitó que hubiese partículas que se alinearan como proyecciones superiores. El volumen evolucionó tras sucesivas rondas de refinamiento, resumidas en la **Figura 4.14B**, hasta el volumen final mostrado en la **figura 4.14C**. Para el cálculo de la resolución total se estimó que a partir de los valores de corte a 0,3 y 0,5 detallados en lo **Materiales y Métodos**, el valor de resolución se encontraba entre los 23 y 25 Å (**Figura 4.14D**). El mapa de densidad electrónica muestra que el complejo DnaK:GrpE es una molécula globular con un tallo aproximado de 90 Å de longitud, mientras que la parte globular del complejo tiene un tamaño aproximado de 80 Å por 50 Å.



**Figura 4.14: Reconstrucción tridimensional del complejo formado por DnaK y GprE.** A. Esquema explicativo de proceso de estricción angular impuesto en parte del procesamiento. B. Resumen de la evolución del mapa de densidad electrónica durante todo el proceso de reconstrucción. C. Mapa de densidad electrónica final del complejo reconstruido. D. Cálculo de la resolución en Angstroms del modelo obtenido.

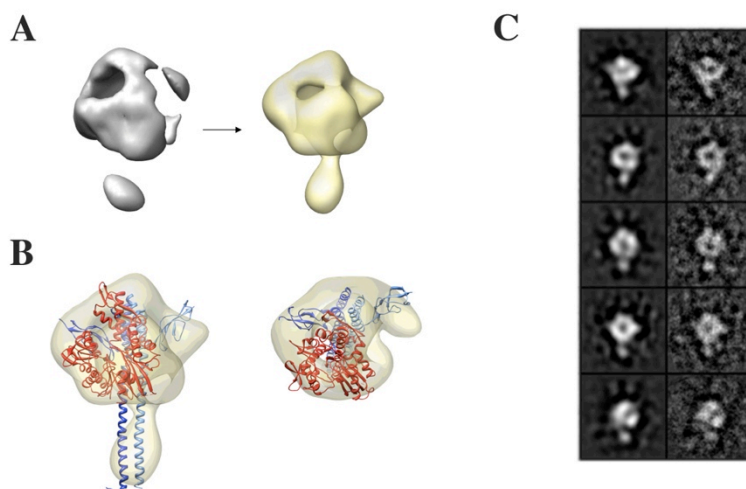
Una método adicional para garantizar la fiabilidad del modelo obtenido consiste en comparar las proyecciones del mapa de densidad electrónica con las media de las partículas asignada. En la **Figura 4.15** se muestra una galería de imágenes en las que se puede comprobar como las proyecciones son compatibles con el modelo obtenido.



**Figura 4.15. Galería de proyecciones del mapa de densidad electrónica y las imágenes medias de las partículas asociadas.** Las imágenes se disponen por pares, siendo las de la izquierda las proyecciones y las de la derecha las medias asociadas.

## 4.9 Localización de cada uno de los dominios de DnaK y GrpE dentro del mapa de densidad electrónica

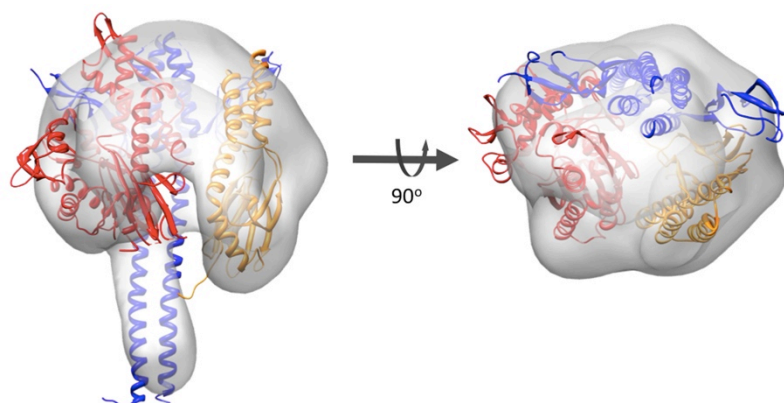
Como ya se ha descrito, paralelamente a la reconstrucción del complejo DnaK:GrpE se llevó a cabo la reconstrucción control del complejo truncado DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE. Adicionalmente, la reconstrucción de este complejo puede darnos información sobre como encajar dentro del volumen las estructuras cristalográficas disponibles.



**Figura 4.16. Reconstrucción tridimensional del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE.** **A.** Procesamiento inicial del volumen. El volumen de la izquierda representa al mapa obtenido como volumen inicial a partir de medias libres de patrón mientras que el volumen de la derecha es el volumen final obtenido. **B.** Vista lateral y superior respectivamente del volumen reconstruido en el que se ha encajado la estructura cristalográfica de Harrison *et al.* (1997). **C.** Galería de proyecciones del mapa de densidad electrónica y las imágenes medias de las partículas asociadas. Las imágenes se disponen por pares, siendo las de la izquierda las proyecciones y las de la derecha las medias asociadas

Para la reconstrucción de este volumen se llevaron protocolos similares que los utilizados para el volumen previamente reconstruido. En este caso se partió como modelo inicial para el refinamiento el obtenido a través de medias libres de patrón tal y como se muestra en la **Figura 4.16A**. El mapa de densidad electrónica obtenido era perfectamente compatible con la estructura de Harrison *et al.*, en 1997 por lo que se encajó sin problemas completando todos los espacios del volumen (**Figura 4.16B**). Asimismo, en la **Figura 4.16C** se muestran cómo las proyecciones del mapa de densidad electrónica coinciden con las media de las partículas asignadas garantizando la fiabilidad del modelo obtenido.

Los resultados obtenidos, a su vez también permiten validar el volumen obtenido de la reconstrucción del complejo formado por DnaK y GrpE. Ambas estructuras son similares y esto permite dar un paso más en el análisis de la estructura pues se pueden utilizar los datos del volumen control para hacer el encaje de estructuras dentro del volumen de GrpE y DnaK.



**Figura 4.17: Encaje molecular de las estructuras cristalográficas disponibles en el mapa de densidad electrónica formado del complejo DnaK:GrpE.** En la imagen se muestra una visión lateral y frontal del volumen reconstruido en el que se han encajado la estructura de GrpE (en azul) a partir de la estructura de Harrison *et al.*, en 1997, así como la de DnaK a partir de la estructura dilucidada por Jiang *et al.* en 2005. En rojo se representa el NBD de DnaK y en amarillo el SBD.

Al observar los mapas de densidad electrónica de cada uno de los complejos reconstruidos se aprecia que el complejo DnaK:GrpE completa presenta una masa adicional en la “cabeza” del volumen. De esta manera, se pudo encajar la estructura cristalográfica de Harrison *et al.* (1997) en el volumen obtenido y DnaK<sub>SBD</sub> a partir de la estructura cristalizada de Jiang *et al.* (2005). En la **Figura 4.17** se presenta la disposición de cada uno de los dominios de DnaK y GrpE, con esta disposición estructural cada uno de los cristales rellena perfectamente el espacio dejado por el mapa de densidad electrónica. De esta manera ambos dominios de DnaK permanecerían en la “cabeza” del mapa de densidad electrónica y el “tallo” de GrpE emergería de la estructura globular superior.

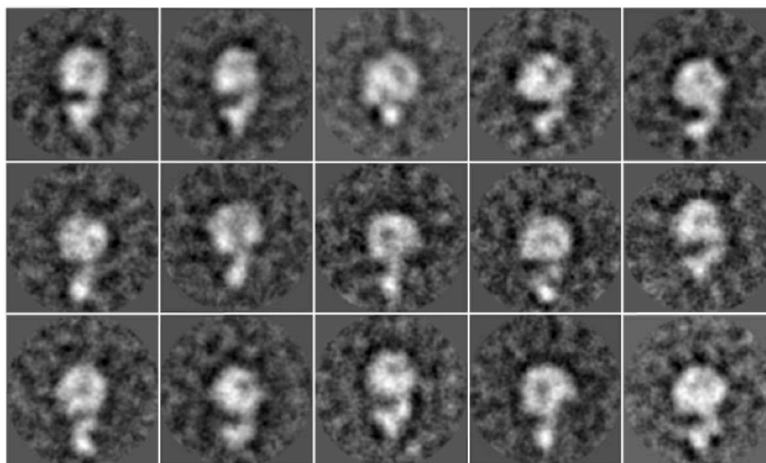
En el apartado de **Discusión** se discutirán las implicaciones que esta disposición estructural conlleva para comprender el mecanismo de funcionamiento de ambas proteínas.

### 4.10 Análisis estructural del extremo amino-terminal de GrpE

Durante todo el análisis tridimensional del complejo formado por las chaperona y su factor intercambiador de nucleótidos ha quedado patente el nivel de dificultad que ha supuesto tratar de aislar aquellas partículas en las cuales se pudiese apreciar de forma adecuada el “tallo” de GrpE. El “tallo” está formado por dos hélices  $\alpha$  de unos 60 aminoácidos y una región

aminoterminal de 33 residuos de estructura nativamente desordenada. A partir de los datos recolectados y mediante las herramientas desarrolladas recientemente para análisis estructural, ha sido posible obtener un poco mas de información sobre la estructura tridimensional del mismo.

En la **Figura 4.18** se muestra una galería de imágenes correspondientes a medias libres de patrón procesadas por el programa CL2D del paquete informático XMIPP (Sorzano et al., 2010). En ellas se observa como el “tallo” de GrpE, en algunos casos, se proyecta hacia la parte de la “cabeza”. Aparentemente, las proyecciones muestran una flexibilidad del “tallo” que pudieran corresponder con una parte de la población en la que éste se encuentra deformado con respecto a la estructura cristalográfica.



**Figura 4.18.** Galería de imágenes medias libres de patrón correspondientes proyecciones laterales del complejo DnaK:GrpE.

Hay que tener en cuenta que al encajar las estructuras moleculares disponibles dentro del mapa de densidad electrónico no se han conseguido ajustar los primeros 33 aminoácidos de estructura desordenada, aparentemente no aparecen en el volumen reconstruido. Esta ausencia es fácilmente explicable debido a la extremada flexibilidad que presentan, y al promediar la estructura es comprensible que puedan desaparecer. Al realizar exhaustivas clasificaciones se han obtenido las medias de la **Figura 4.18** que tan sólo contienen en torno a 30 partículas por imagen haciendo que de otra manera puedan distinguirse variabilidades internas dentro de la molécula. Todo esto se discutirá más adelante en el apartado de la **Discusión**.

# Discusión

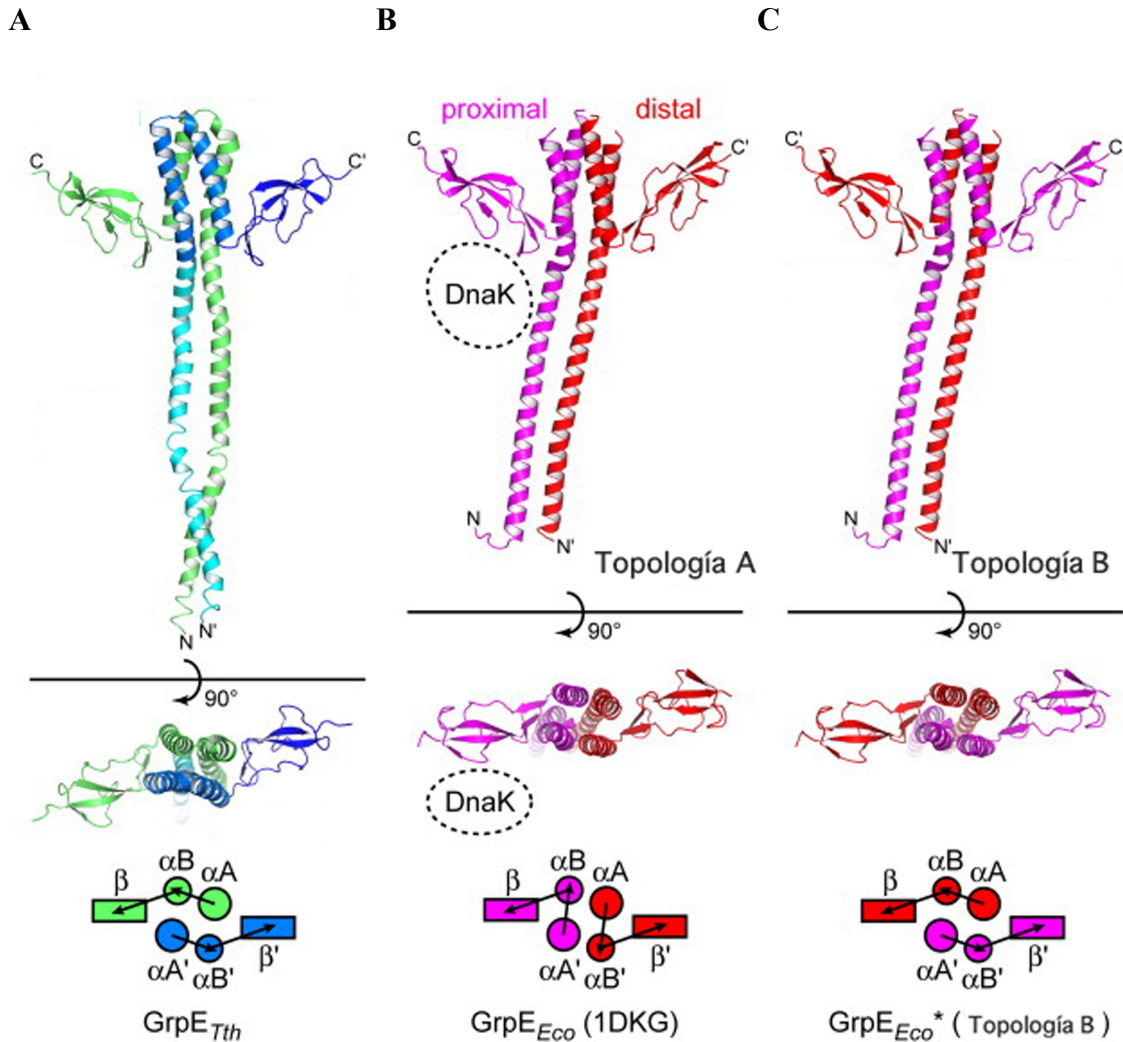




El correcto plegamiento de las proteínas es fundamental para la viabilidad de todos los organismos. Es importante mantener a las células exentas de proteínas desnaturalizadas que podrían resultar incluso tóxicas. Para ello la evolución ha desarrollado sistemas proteicos especializados en asistir el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, en replegar proteínas desplegadas y en reciclar polipéptidos inestables. Las proteínas responsables de este sistema de control de calidad se han denominado chaperonas moleculares. En el caso de la bacteria *E. coli*, dos son los sistemas principales encargados del correcto plegamiento de las proteínas, el sistema de chaperonas llamado KJE, formado por la chaperona DnaK (del tipo Hsp70), la chaperona DnaJ (del tipo Hsp40) y el intercambiador de nucleótidos GrpE, y el sistema GroEL-GroES formado por las chaperonas GroEL (del tipo Hsp60 o chaperonina) y GroES (del tipo Hsp10 o cochaperonina) (Hartl y Hayer-Hartl, 2002).

En el citoplasma de *E. coli* se expresan tres chaperonas Hsp70 denominadas DnaK, HscA (Hsc66) y HscC (Hsc62) que actúan de forma coordinada y poseen sus propias cochaperonas (Yoshimune *et al.*, 2002). De todas ellas, DnaK es la mejor caracterizada. El gen que codifica DnaK está regulado por el factor de transcripción  $\sigma_{32}$  y, aunque se expresa constitutivamente (27  $\mu$ M a 30 °C), su concentración se duplica en condiciones de choque térmico (54  $\mu$ M a 42 °C) (Mogk *et al.*, 1999). En cambio, HscA y HscC no son inducibles por choque térmico pero su expresión puede aumentar por otros procesos fisiológicos, como es el paso a fase estacionaria durante el crecimiento celular (Genevaux *et al.*, 2007). DnaK interacciona reversiblemente con regiones hidrofóbicas de sustratos proteicos y participa en diversos procesos celulares: plegamiento proteico, ensamblaje y desensamblaje de estructuras proteicas, reparación y remodelado de DNA (Goldfless *et al.*, 2006), e incluso es capaz de solubilizar y replegar pequeños agregados proteicos (Mogk *et al.*, 1999). Junto con su cochaperona DnaJ y con el intercambiador de nucleótido GrpE, DnaK es capaz de asistir al plegamiento *in vivo* del 5-18 % de las proteínas bacterianas (preferiblemente proteínas entre 14 y 90 kDa) y, junto a la chaperona TF (del inglés *Trigger Factor*), forma parte del sistema de control de plegamiento de las proteínas sintetizadas *de novo* en los ribosomas. En condiciones fisiológicas, la eliminación de DnaK no tiene efectos fenotípicos, pero la eliminación conjunta de DnaK y TF da lugar a un fenotipo letal (Deuerling *et al.*, 1999). Por otra parte, su ausencia en condiciones de estrés térmico provoca la muerte celular por agregación proteica. Además de la función en el plegamiento proteico, DnaK participa en la regulación de la división celular (Paek y Walker, 1987), de la síntesis de DNA tras la exposición de las células a temperaturas de choque térmico (Sakakibara, 1988) y de la regulación de la actividad de factores de transcripción como RepA (Wickner *et al.*, 1991). DnaK también interviene en la autorregulación de la respuesta de choque

térmico por medio de la interacción directa con el factor de transcripción  $\sigma 32$  (Gamer *et al.*, 1992).



**Figura 5.1: Comparación estructural de la GrpE de *Thermus thermophilus* (*GrpE<sub>Tth</sub>*) con la GrpE de *E. coli* (*GrpE<sub>Eco</sub>*).** Todas las arquitecturas posibles de *GrpE<sub>Tth</sub>* (A), *GrpE<sub>Eco</sub>* publicada (B) y *GrpE<sub>Eco</sub>* propuesta (C). En la parte superior se muestran las diferentes estructuras de las GrpEs en una vista lateral y en la parte inferior con una rotación de 90°. En la parte inferior también se muestra de forma esquemática la topología representada. De la misma manera, en B aparece representada con una línea de puntos negra la posición que ocuparía DnaK, de acuerdo a la estructura atómica de Harrison et al (1997). Los círculos  $\alpha A$  y  $\alpha B$ , así como  $\alpha A'$  y  $\alpha B'$  indican regiones en  $\alpha$ -hélice de la “cabeza” de GrpE que corresponderían al mismo monómero respectivamente según los datos cristalográficos de *GrpE<sub>Tth</sub>*. Por tanto, Nakamura *et al.* proponen la topología B como una nueva reinterpretación de la estructura cristalográfica de Harrison *et al.* (1997). Imagen modificada de Nakamura *et al.* (2009).

Como se ha detallado, GrpE es la proteína que induce el intercambio de nucleótido después de que el DnaK<sub>NBD</sub> hidrolice la molécula de ATP, promoviendo así la liberación de ADP y Pi, así como la unión de otra molécula de ATP a DnaK<sub>NBD</sub>. GrpE es una proteína dimérica formada por

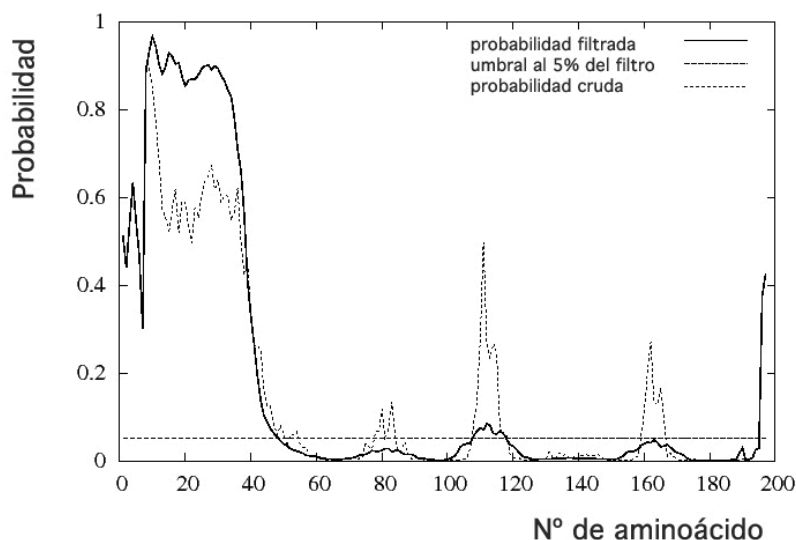
monómeros de 22 kDa y su expresión en *E. coli* también está regulada por el factor de transcripción  $\sigma_{32}$ . El monómero de GrpE consta de 197 aminoácidos y se ha resuelto la estructura cristalográfica del mutante inactivo GrpE ( $\Delta 1-33$ ; G122D) unido al dominio ATPasa de DnaK (Harrison *et al.*, 1997). GrpE está organizada en tres dominios estructurales: un dominio N-terminal que forma una hélice  $\alpha$  de 100 Å, dos hélices más cortas conectadas al dominio N-terminal mediante un giro, y un dominio C-terminal formado por un sándwich  $\beta$  compuesto por seis hebras (**Figuras 1.9 y 5.1B**).

Existe una segunda estructura de GrpE, en este caso de la bacteria *Thermus thermophilus* HB8, que revela una arquitectura común (Nakamura *et al.*, 2009) (**Figura 5.1A**). Dicha estructura cristalina añade información acerca de una posible malinterpretación en la unión de dos cadenas polipeptídicas de la “cabeza”. Harrison *et al.* interpretaron la región  $\alpha$ -helicoidal situada en la “cabeza” del modelo de GrpE de *E. coli* a partir de una densidad electrónica muy débil y discontinua. La baja resolución en dicha zona no permitió discernir de qué manera están conectadas las hélices de la “cabeza” de GrpE. Existen dos cadenas que unen el ramillete formado por cuatro hélices  $\alpha$  pertenecientes a los dos monómeros pero Nakamura *et al.* proponen una nueva disposición a la publicada al haber conseguido una mayor resolución de la misma zona en la GrpE de *Thermus thermophilus*. Según sus datos se propone una topología B, representada en la **Figura 5.1**, por homología entre especies para una misma GrpE según los datos obtenidos.

### 5.1 Caracterización estructural de DnaK:GrpE

La reconstrucción tridimensional del complejo DnaK:GrpE obtenida por microscopía electrónica y procesamiento de imagen (**Figura 4.17**) muestra una estructura de unos 90 Å de longitud formada por un dominio globular con unas dimensiones general de 50 x 80 Å y un “tallo” de unos 40 Å de longitud. En el mapa de densidad electrónica obtenido se han podido encajar de manera inequívoca las estructura atómicas de DnaK<sub>NBD</sub> y GrpE obtenidas por Harrison *et al.* (1997). Para ello ha sido necesaria la confirmación de la reconstrucción control de GrpE:DnaK<sub>NBD</sub> (**Figura 4.16B**). Según el mapa de densidad DnaK<sub>NBD</sub> se muestra interaccionando con el dominio C-terminal de GrpE, tal y como se describe en la estructura cristalográfica de DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE. En ella, el surco central del DnaK<sub>NBD</sub> se encaja sobre el dominio de laminas  $\beta$  de uno de los monómeros de GrpE, de manera que toda la molécula de DnaK<sub>NBD</sub> contacta con diferentes regiones de GrpE, incluyendo los dominios helicoidales de la “cabeza”, las laminas  $\beta$  e incluso la parte proximal del “tallo”. Una vez asignado el dominio DnaK<sub>NBD</sub> dentro del volumen se ha podido asignar fácilmente el dominio de unión a sustrato. De esta forma, DnaK<sub>SBD</sub> se asentaría sobre la parte de la “cabeza” del otro monómero de GrpE.

Hay que tener en cuenta que, a diferencia de la estructura cristalizada, en nuestro caso se encuentran presentes los primeros 33 aminoácidos de GrpE. La naturaleza de este fragmento, como ya se ha explicado anteriormente, es extremadamente flexible, ya que se dispone espacialmente como una región nativamente desestructurada. En la **Figura 5.2** se representa la predicción de regiones desordenadas para GrpE en forma de diagrama y a lo largo de la secuencia. Los resultados muestran que los primeros 40 residuos N-terminales presentan una probabilidad muy superior al 5% necesario para considerarse estructura naturalmente desordenada. Si se analiza el mapa de densidad electrónico obtenido detalladamente se observa que el encaje de la estructura no cubre dichos 33 aminoácidos, la densidad electrónica desaparece a la altura del aminoácido 35. Esto es sencillo de explicar puesto que la flexibilidad que le confiere la naturaleza desestructurada de la región irremediablemente hace que el promediado de las diferentes posiciones espaciales que ocupa se pierda y no quede reflejado en la estructura final.



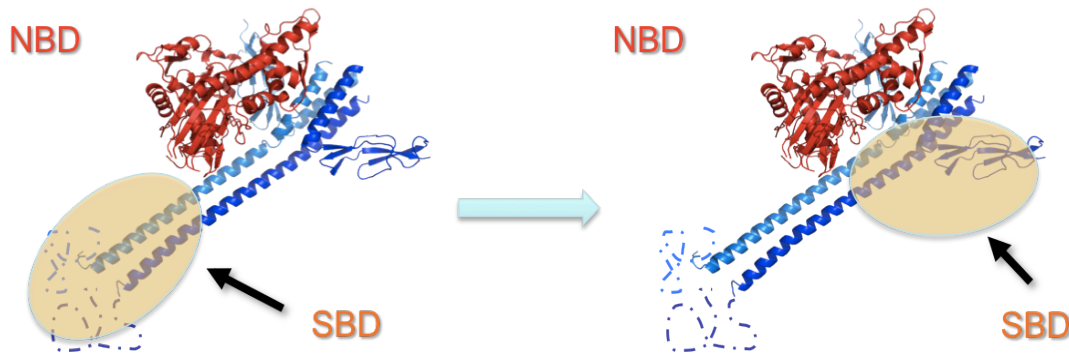
**Figura 5.2: Diagrama de predicción de estructura desordenada de la proteína GrpE.** En el gráfico se representa la probabilidad a lo largo de la secuencia de que una determinada zona presente estructura nativamente desordenada. Según los resultados obtenidos GrpE, presentaría una región desestructurada en torno a sus primeros 40 aminoácidos. Gráfico obtenido a través del programa PSIPRED del grupo de bioinformática del University College of London (Ward *et al.*, 2004).

Combinando la información de la estructura atómica del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE con las reconstrucciones tridimensionales obtenidas en esta tesis de los complejos DnaK:GrpE y DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE, se ha podido localizar todos los dominios del complejo. Tanto DnaK<sub>NBD</sub> como GrpE se han localizado gracias a la estructura atómica del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE, que se ajusta perfectamente en las dos reconstrucciones tridimensionales, mientras que DnaK<sub>SBD</sub> se ha

localizado combinando la reconstrucción tridimensional del complejo DnaK:GrpE con la del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE, al que le falta DnaK<sub>SBD</sub>. De todo ello se deduce que la parte globular del complejo DnaK:GrpE contiene la molécula completa de DnaK (DnaK<sub>NBD</sub> y DnaK<sub>SBD</sub>) unida a la “cabeza” de GrpE, siendo el “tallo” del volumen la doble hélice del dominio N-terminal de GrpE. La disposición de DnaK<sub>SBD</sub> con respecto a la molécula de GrpE ya ha sido cuestionada previamente por diferentes grupos en distintos estudios realizados. En principio no tendría por que ser necesaria la interacción de DnaK<sub>SBD</sub> con GrpE. La interacción de GrpE con DnaK<sub>NBD</sub> por sí misma originaría un cambio conformacional que estimularía de manera más eficiente la liberación del ADP y esa información sería transmitida a DnaK<sub>SBD</sub> facilitando una liberación más rápida del sustrato. No obstante, existen una serie de experimentos que apuntan hacia la interacción de GrpE con DnaK<sub>SBD</sub>. De acuerdo a los estudios bioquímicos publicados (Chesnokova *et al.*, 2003; Brehmer *et al.*, 2004; Moro *et al.*, 2007), la región de unión a sustrato de DnaK<sub>SBD</sub> interaccionan con los 33 residuos N-terminales de GrpE. Los experimentos de resonancia de plasmón de superficie han mostrado que la unión de GrpE con DnaK<sub>SBD</sub>, en concreto con la región que comprende los residuos 393 al 507, es inhibida por la adición de un péptido sustrato. Además, no existe interacción alguna entre DnaK<sub>SBD</sub> y GrpE cuando a esta última se le quitan sus primeros 33 aminoácidos (Chesnokova *et al.*, 2003). Los experimentos de dicroísmo circular de Brehmer *et al.* (2004) han revelado que ese mismo mutante de eliminación de GrpE ve reducir considerablemente la eficiencia en el replegamiento de luciferasa. Además, análisis termodinámicos mediante calorimetría isoterma de titulación han mostrado que la región 1-33 de GrpE contribuye positivamente a la interacción con DnaK (Moro *et al.*, 2007). Todos estos resultados parecen indicar que la región desestructurada de GrpE puede actuar a modo de pseudosustrato para DnaK, compitiendo con el sustrato por la zona de unión peptídica de DnaK<sub>SBD</sub>.

En este sentido, la estructura alargada de GrpE sugiere que DnaK<sub>SBD</sub> se podría posicionar a lo largo de la doble hélice amino-terminal de GrpE e interaccionar con sus primeros residuos. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir del modelo de microscopía electrónica muestran a DnaK<sub>SBD</sub> claramente situado junto al monómero libre de GrpE, a la altura de la “cabeza”. La asimetría del complejo GrpE:DnaK hace preguntarse cuál es la razón de la dimerización de GrpE, ya que según lo que se sabe hasta ahora de la interacción entre DnaK<sub>NBD</sub> y GrpE no parece necesaria la presencia de otro monómero de GrpE. La hipótesis más inmediata es la de que un monómero adicional de GrpE daría estabilidad al complejo. A partir de aquí parecía lógico cuestionarse el sentido funcional de una estructura tan alargada. Es por ello que muchos autores han supuesto que DnaK<sub>SBD</sub> debía situarse en esta zona. En la **Figura 5.3** se representan las posiciones relativas del DnaK<sub>SBD</sub> en función de lo que se asumiría atendiendo a los resultados bioquímicos descritos anteriormente (izquierda) y lo obtenido con la nueva estructura

completa del complejo (derecha).



**Figura 5.3: Esquema representativo de las posiciones relativas de DnaK<sub>SBD</sub> sobre la estructura de GrpE.** En la figura de la izquierda se muestra la disposición de cada uno de los dominios de DnaK, con DnaK<sub>SBD</sub> interaccionando con el “tallo” de GrpE. En la figura de la derecha se dibuja el lugar en que la reconstrucción tridimensional obtenida dispone a DnaK<sub>SBD</sub>, en la “cabeza” de GrpE.

### 5.1.1 Flexibilidad conformacional en el “tallo” de GrpE

Llegados a este punto los resultados obtenidos por microscopía en los que el DnaK<sub>SBD</sub> se encuentra en la zona de la “cabeza” de GrpE y no en su “tallo” aparentemente serían incompatibles con la interacción de DnaK<sub>SBD</sub> con la región N-terminal de GrpE, sugerida por resultados bioquímicos. La forma de conciliar en parte ambos tipos de resultados viene dada a partir de los resultados expuestos en la **Figura 4.18**, que muestran que gracias a un análisis bidimensional exhaustivo con las últimas herramientas bioinformáticas se ha conseguido seleccionar una serie de partículas que muestran cómo parte del “tallo” de GrpE se proyecta hacia la “cabeza” del complejo. Hay que unir a esto que tanto en la estructura reconstruida del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE como la del complejo completo, el mapa de densidad electrónica no da cuenta de la molécula completa de GrpE. Como hemos detallado previamente, los primeros 33 aminoácidos de estructura desordenada no aparecen en el modelo por microscopía de la misma manera que tampoco aparecen en el modelo cristalográfico de Harrison et al. (1997), debido en ambos casos a la flexibilidad de la zona en cuestión. Los resultados obtenidos en los análisis bidimensionales de la subpoblación descrita en la **Figura 4.18** sí que consiguen resolver la región N-terminal y podrían ser interpretados como que dicha región, extremadamente flexible, se prolonga en algunos casos hacia la zona globular del complejo, hacia DnaK<sub>SBD</sub>. Estos resultados vendrían a esclarecer de qué manera DnaK<sub>SBD</sub>, aun localizado en la “cabeza” de GrpE, podría ser capaz de interactuar con la región N-terminal de GrpE de una manera hasta ahora nunca descrita en bibliografía. De esta manera, la teoría del pseudosustrato sigue siendo compatible con el mapa de densidad electrónica obtenido.



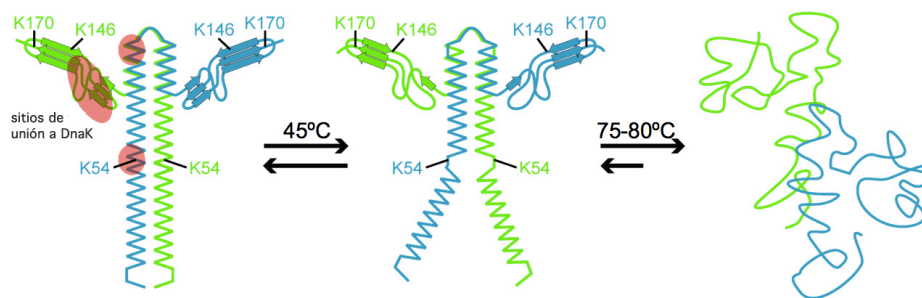
Estos resultados además permiten ciertas reflexiones. Las hipótesis propuestas hasta ahora en las que el DnaK<sub>SBD</sub> se localizaba en el “tallo” de GrpE hacían cuestionarse por qué los 33 residuos del dominio N-terminal de GrpE, que se encontraban así cerca del DnaK<sub>SBD</sub> y debido a su capacidad de interaccionar con él, no bloqueaban constantemente el bolsillo de unión a sustrato. Con el modelo propuesto en el que los 33 residuos serían los que se proyectarían hacia el SBD debido a la flexibilidad del “tallo”, resulta mas fácil de comprender el mecanismo de liberación de sustrato. Nuestro modelo sugiere que GrpE, además de actuar como factor de intercambio de nucleótido, participa activamente en la liberación del sustrato. Su prominente “tallo”, flexible en su parte más alejada, podría oscilar entre una serie de estados conformacionales desde una posición apartada del bolsillo de unión a sustrato hasta un estado flexionado. En este estado sería capaz de contactar con el SBD interaccionando de manera transitoria y a su vez compitiendo por la región de unión a sustrato y desplazando a la proteína unida a él. A su vez el hecho de que DnaK<sub>SBD</sub> aparezca asentada sobre el otro monómero de la “cabeza” de GrpE añade sentido a la naturaleza dimérica de GrpE. En resumen, este nuevo mecanismo que se propone serviría para explicar la razón de la estructura tan alargada de GrpE y su naturaleza dimérica.

### 5.1.2 Hipótesis de la función termosensora de GrpE

Por otro lado nuestros resultados serían perfectamente compatibles con la hipótesis de termosensor asignada a GrpE por varios grupos. A lo largo de estos años han aparecido estudios en los que GrpE muestra dos transiciones térmicas. La primera aparece en torno a los 35 °C y se estabiliza a los 45-50 °C (Grimshaw *et al.*, 2001), rango que coincidiría con las temperaturas de estrés térmico. Esta transición ha sido asignada más tarde a un desplegamiento reversible de las largas hélices que forman la parte N-terminal (Grimshaw *et al.*, 2003). La desnaturalización completa de GrpE se da a partir de los 75 °C tal y como se muestra en la **Figura 5.4**. La explicación funcional para este fenómeno es que en la primera transición térmica y bajo estas condiciones de estrés, GrpE mantendría su estructura dimérica y su capacidad de interacción con DnaK (Wu *et al.*, 1996), aunque disminuiría considerablemente su capacidad como factor de intercambio de nucleótido (Gelinas *et al.*, 2003). El papel de GrpE como termosensor también ha sido estudiado en la GrpE de otros organismos como *Thermus thermophilus* o *Saccharomyces cerevisiae* (Mge1), que se comportan de forma parecida a la GrpE de *E. Coli*, pero con rangos diferentes de temperatura (Groemping & Reinstein, 2001; Nakamura *et al.*, 2009).

En resumen, GrpE regularía el ciclo de DnaK acelerando el intercambio de ADP/ATP con la consecuente liberación del sustrato. En condiciones de estrés térmico el parcial desplegamiento

de GrpE haría disminuir la tasa de intercambio de ADP/ATP, y DnaK permanecería más tiempo unida a su sustrato. Esto evitaría la liberación del sustrato en condiciones de choque térmico, en las que sus probabilidades de encontrar las vías de plegamiento productivas son bajas, y por lo tanto impediría su agregación. Las hélices  $\alpha$  se volverían a plegar al cesar el estrés térmico, acelerando el intercambio de ADP por ATP y la liberación del sustrato del complejo para su posterior plegamiento (Groemping & Reinstein, 2001).



**Figura 5.4: Estados de transición térmica en la conformación de GrpE de *E. coli*.** Durante la primera transición a los 45 °C los sitios de unión de DnaK en lámina  $\beta$  y regiones  $\alpha$ -hélice se despliegan de forma reversible y como consecuencia GrpE pierde su función como factor de intercambio de nucleótido pero puede seguir manteniendo unida la molécula de DnaK. En la segunda transición a los 75 °C DnaK perdería su función por completo al desnaturalizarse irreversiblemente. Imagen modificada de Nakamura *et al.*, 2009.

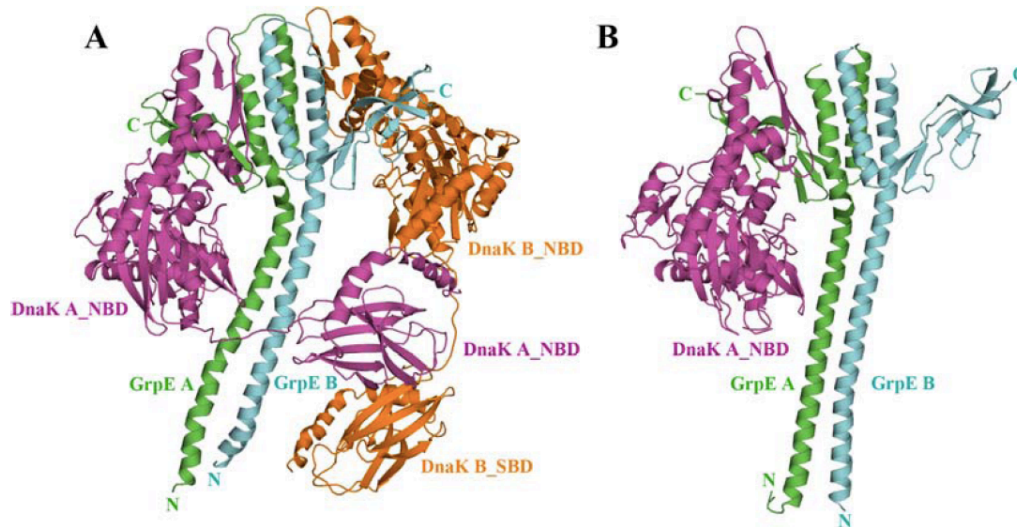
En contraposición, los estudios de Moro *et al.* en 2007 también proponen una segunda zona de interacción entre los residuos 34-69 de GrpE y DnaK<sub>SBD</sub>. Según los autores, esta interacción daría estabilidad a la molécula. Estos resultados serían incompatibles con la localización de DnaK<sub>SBD</sub> obtenida en este trabajo. La interacción propuesta por los citados autores se basa en estudios de protección frente a la digestión de papaína cuando DnaK se encuentra unida a GrpE. Los estudios de Harrison *et al.* (1997) también apuntan a una interacción de DnaK en torno a la zona del E53 de GrpE que atribuyen a que una mutación en ese residuo resulta en un fenotipo sensible a la temperatura. Los dos estudios en ningún caso demuestran de forma clara que exista tal interacción. Probablemente, la importancia de la región citada tenga más relación con la flexibilidad del “tallo” de GrpE y también posiblemente la aparente protección proteolítica de GrpE se deba a la estabilización de DnaK al mantener durante más tiempo el “tallo” curvado hacia DnaK<sub>SBD</sub> e impedir el acceso de la enzima proteolítica.

### 5.1.3 Aparición de una estructura alternativa del complejo DnaK:GrpE

Los experimentos realizados en condiciones fisiológicas han revelado que GrpE forma un complejo de estequiometría DnaK:GrpE 1:2 (Schonfeld *et al.*, 1995). Nuestros experimentos de cromatografía, geles de electroforesis, así como la microscopía realizada así lo confirman. No



obstante, recientemente se ha publicado una segunda estructura cristalográfica, la del complejo DnaK:GrpE de *Geobacillus kaustophilus* (**Figura 5.5A**) en el que la estequiometría de unión es 2:2 (Wu *et al.*, 2012). Este modelo entra en conflicto con todas las publicaciones previas, así como con los resultados obtenidos en esta tesis. Por ello que se detallarán a continuación los motivos por los cuales la estructura obtenida no debe ser tomada en cuenta.



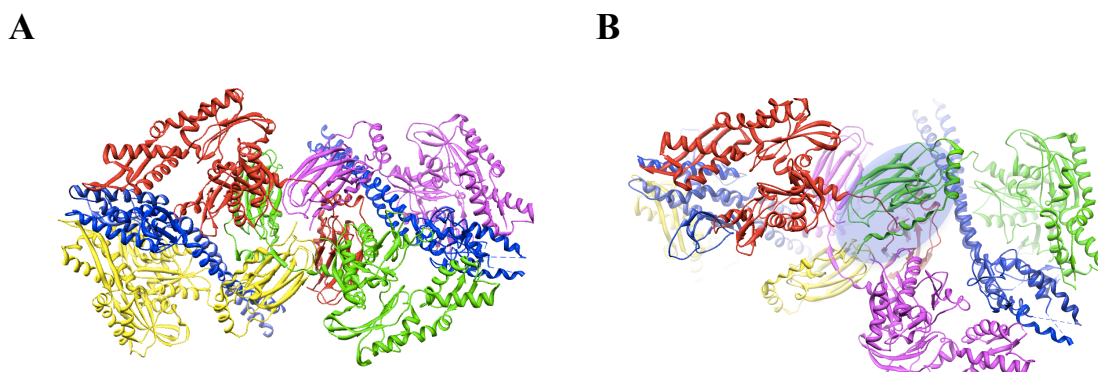
**Figura 5.5: Estructuras cristalográficas de complejo DnaK:GrpE.** A. Estructura propuesta para el complejo completo de DnaK:GrpE de *Geobacillus kaustophilus* publicada por Wu *et al.*, (2012). B. Estructura del complejo DnaK<sub>NBD</sub>:GrpE resuelta por Harrison *et al.* (1997).

En los experimentos bioquímicos mostrados en la publicación de Wu *et al* (2012), se utilizan tampones no fisiológicos, en los que no se añade ni ADP ni  $K^+$  que son para la interacción. La unión de ATP ó ADP a DnaK<sub>NBD</sub> se encuentra coordinada por átomos de  $K^+$  y  $Mg^{2+}$ , que son fundamentales para la interacción. Si se observa el mapa cristalográfico de la celda completa (**Figura 5.6**), se puede deducir cómo la estructura obtenida probablemente sea un artefacto forzado por las condiciones de cristalización.

En la celda cristalina, la unidad de simetría son cuatro moléculas de DnaK<sub>SBD</sub>, que forman un tetramero artificial (**Figura 5.6A**), probablemente favorecido por la capacidad de autoasociación que tiene DnaK<sub>SBD</sub> (Benaroudj *et al.*, 1995, Benaroudj *et al.*, 1997; Amor-Mahjoub *et al.*, 2006). Los lazos de unión de dos de los DnaK<sub>SBD</sub> están "mordidos" por los bolsillos de unión a sustrato de los otros dos DnaK<sub>SBD</sub> (ver zona azul de la **Figura 5.6B**).

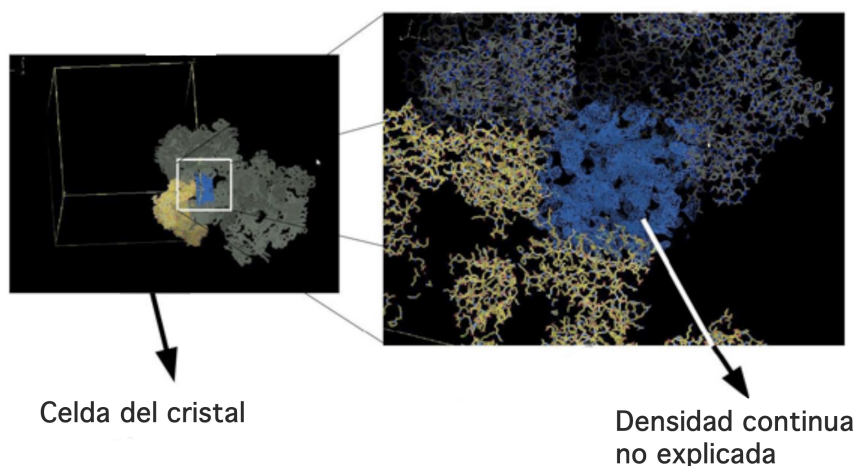
Si se analizan y calculan los mapas de densidad electrónica, se hace evidente el hecho de que la estructura no está bien resuelta. Estudiando la densidad electrónica depositada se pueden encontrar segmentos de la unidad asimétrica con densidad electrónica no explicada por el modelo (**Figura 5.7**). Es decir, existe masa adicional o diferente de la finalmente resuelta en el

artículo, lo que explica el alto Rf. En resumen, el modelo o es incorrecto o no es completo, o bien el grupo espacial no está correctamente asignado. Asumiendo que las fases han sido correctamente determinadas y por tanto se asume el mapa de densidad electrónica, hay que valorar el modelo atómico generado por los autores. La unidad asimétrica que presentan consta de una unidad 2xGrpE-1xDnaK repetida dos veces y enlazada por una especie de dominio cruzado a través de otra molécula de DnaK, de manera que tampoco el supuesto complejo 2:2 no tiene sentido como tal.



**Figura 5.6: Modelo cristalográfico de la interacción entre DnaK y GrpE (Wu *et al.*, 2012).** A. Celda del cristal formada por un tetrámero de DnaKs. B. Detalle de una molécula de DnaK<sub>SBD</sub> "mordiéndose" el lazo de otra molécula de DnaK<sub>SBD</sub>. Imagen obtenida a partir de los datos cristalográficos de Wu *et al* (2012).

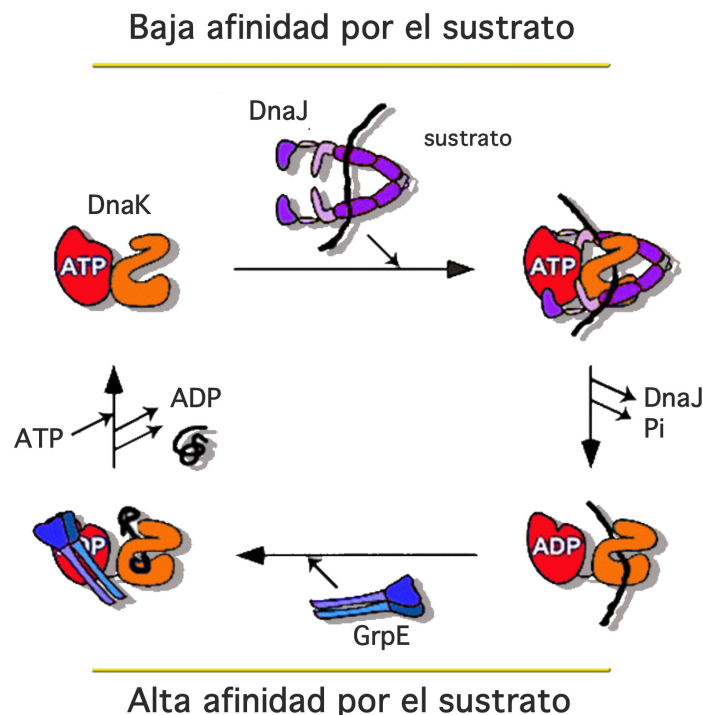
Los autores del trabajo proponen una resolución de 4.1Å y un  $R_w/R_f = 27.2/34.4$ . El Rf debe siempre estar por debajo de 30, pues una estructura al azar refinada con datos al azar da un Rf entorno a 38-40. El hecho de que el Rf tenga un valor de 34.4 y la diferencia entre Rf y  $R_w$  sea de 7.2% para una estructura supuestamente resuelta por fases experimentales implica que el modelo resuelto no es aceptable ya que está sobreestimado. De esta manera no se tendrá en cuenta el modelo obtenido para la discusión de los resultados.



**Figura 5.7: Detalle del mapa de densidad electrónico de la estructura de Wu *et al* (2012).** En la figura se muestra la aparición de una densidad continua no justificada en el modelo obtenido.

## 5.2 Caracterización funcional de DnaK y GrpE

Los experimentos bioquímicos llevados a cabo han tratado de confirmar desde el punto de vista funcional el modelo estructural del complejo DnaK:GrpE obtenido por microscopía electrónica y procesamiento de imagen. Los experimentos bioquímicos revelan la elevada afinidad de que existe entre DnaK y GrpE. Los ensayos de retardo en gel nativo, como punto de partida, muestran claramente la formación de un complejo al combinar DnaK y GrpE en presencia de ADP. De la misma manera, las interacciones entre mutantes son igual de estables. En estos ensayos se puede apreciar el fenómeno de autoasociación de DnaK, ya que se aprecian bandas de mayor retardo por encima de la propia proteína o de los complejos, y es que DnaK es capaz de formar distintos oligómeros a través del extremo C-terminal de la proteína (Benaroudj *et al.*, 1995, Benaroudj *et al.*, 1997; Amor-Mahjoub *et al.*, 2006). Se ha demostrado que en presencia de ADP este tipo de asociaciones disminuye considerablemente (Bukau *et al.*, 2006). Este no es el caso para el mutante alostérico DnaK<sub>R151A</sub>, que ha perdido la comunicación entre los dos dominios, y que en presencia de ADP muestra una mayor proporción de bandas con más retardo en los geles.



**Figura 5.8:** Ciclo funcional de DnaK acompañada de sus cochaperonas principales.

El ciclo funcional canónico de DnaK (**Figura 5.8**) se inicia cuando su cochaperona DnaJ presenta a DnaK (en su conformación unida a ATP) el sustrato a plegar (aunque éste puede ser también reconocido directamente por DnaK). A pesar de que la afinidad de DnaK por el ATP es

elevada ( $K_d \sim 1$  nM), su constante catalítica es bastante lenta ( $k_{cat} \sim 3,01$  seg<sup>-1</sup>), y de esta manera se favorece un estado estable de DnaK unido a ATP. Esta unión induce cambios conformacionales en la estructura de DnaK que desencadenan un descenso de su afinidad por el sustrato (Karzai & McMacken, 1996). El estado DnaK-ADP producto de la hidrólisis de ATP muestra una alta afinidad por el sustrato. A pesar de que la afinidad de DnaK por el ADP es 25 veces inferior que por el ATP, el intercambio de nucleótido en estas condiciones es muy lento ( $\sim 0,0010$  seg<sup>-1</sup>) y requiere la presencia del intercambiador de nucleótido, función que realiza GrpE. La interacción de GrpE con DnaK-ADP incrementa el intercambio de ADP por ATP  $\sim 5.000$  veces dando lugar de nuevo a una molécula de DnaK con ATP, que libera el sustrato y está lista para empezar un nuevo ciclo de atrapamiento de sustrato.

### 5.2.1 Análisis espectroscópicos de la interacción entre GrpE:DnaK y sustrato

Para entender el mecanismo de interacción entre DnaK y GrpE, se realizaron experimentos de fluorescencia, utilizando el péptido dNR que es un sustrato de elevada afinidad por DnaK. El dansilo acoplado al péptido aumenta la emisión de fluorescencia de DnaK al interaccionar con ella. En el ensayo se emplearon los tres tipos de GrpE purificados (GrpE, GrpE<sub>34-197</sub> y GrpE<sub>69-197</sub>), dos de los cuales tienen parte de su secuencia truncada y pueden por lo tanto ofrecer información de la importancia de cada una de las regiones ausentes.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos de fluorescencia, la unión a DnaK de GrpE y GrpE<sub>34-197</sub> provoca una mayor exposición del sitio de unión a sustratos a la chaperona, por lo que se observan cinéticas rápidas de unión de dNR. Las propiedades alostéricas de DnaK han sido estudiadas desde diferentes aproximaciones (Laufen *et al.* 1999; Han y Christen, 2011) y estos resultados confirman que es necesario que DnaK mantenga la comunicación alostérica entre sus dominios para que el ciclo de funcionamiento sea eficiente, ya que no se detectan los mismos efectos para el mutante alostérico DnaK<sub>R151A</sub>. En los experimentos con el mutante DnaK<sub>R151A</sub> éste se comporta de manera similar, independientemente de su unión con cualquiera de los mutantes de GrpE, y esto es debido a que no hay comunicación entre DnaK<sub>NBD</sub> y DnaK<sub>SBD</sub>.

Analizando de nuevo la función de los primeros 33 aminoácidos de GrpE, se observa que el mutante que no posee esos residuos muestra una menor unión del sustrato a DnaK debido a que esos residuos de la cochaperona compiten con el sustrato por la unión a DnaK<sub>SBD</sub>. La interacción con GrpE<sub>69-197</sub> impide la unión del péptido a DnaK silvestre, lo que es compatible

con la liberación rápida del sustrato que induce el mutante de eliminación como se ha observado anteriormente (Moro *et al.*, 2007). Se observa un efecto similar cuando se realizan cinéticas de unión en presencia de ATP. Esto podría indicar que el mutante GrpE<sub>69-197</sub> induce un conformación abierta de DnaK<sub>SBD</sub> que impide una unión estable del sustrato con la chaperona.

Estos resultados sugieren que GrpE actúa como un modulador alostérico de DnaK. Posiblemente la unión de GrpE a DnaK induce en la chaperona una conformación en la que DnaK<sub>NBD</sub> y DnaK<sub>SBD</sub> interaccionan, tal y como se sugería en Moro *et al.* (2007), de tal manera que su sitio de unión se desestabiliza parcialmente. Además de eso, los residuos 34-68 de GrpE parecen ser necesarios para que se produzca una unión estable del sustrato (Moro *et al.* en 2007; Harrison *et al.*, 1997) aunque según nuestros resultados esto no tiene que implicar necesariamente que DnaK interaccione con estos residuos tal y como se explicó previamente.

El mecanismo del intercambio de nucleótidos mediado por GrpE implica la apertura de la pinza de DnaK<sub>SBD</sub> (Harrison *et al.*, 1997). Este mecanismo es diferente al observado en otros intercambiadores de nucleótidos, lo que indica que los factores de intercambio de nucleótidos han evolucionado independientemente en sus mecanismos de acción (**Figura 1.8**). Se ha estimado que la interacción de GrpE con DnaK<sub>NBD</sub> aumenta ~5000 veces la velocidad de disociación del complejo DnaK(ADP) (Packschies *et al.*, 1997), y que el complejo GrpE:DnaK:sustrato se mantiene estable hasta que DnaK une ATP. Parte de la estabilidad del complejo se explica por la extensa superficie de contacto entre DnaK<sub>NBD</sub> y la “cabeza” de GrpE, en torno a 2800 Å<sup>2</sup> (Harrison *et al.*, 1997; Janin, 1995; La Conte *et al.*, 1999).

### 5.2.2 Estudios de accesibilidad proteolítica del complejo DnaK:GrpE

A pesar de que los resultados de microscopia son claros y los controles dan fiabilidad al modelo con el fin de reforzar nuestras hipótesis se realizaron experimentos de proteólisis parcial con papaína. Los resultados obtenidos en la **Figura 3.4** en primer lugar ponen de manifiesto cómo la estructura conformacional de DnaK en ausencia de GrpE se ve afectada por la presencia de ADP ó ATP. En presencia de este último nucleótido, DnaK presenta una conformación cerrada en la que ambos dominios permanecen cercanos protegiendo al lazo de unión del ataque proteolítico de la enzima. Cuando DnaK está en presencia de ADP, los dos dominios están separados y el lazo de unión está perfectamente accesible, por lo que se observa una mayor tasa digestión en esta zona. Incluso más patente es el caso en ausencia de nucleótido donde la digestión es máxima. En el caso de que GrpE se encuentre unida a DnaK en presencia de ADP la situación cambia drásticamente, y en este caso el lazo de unión de DnaK se ve protegido del ataque proteolítico. Cabría esperar que GrpE estuviese protegiendo la zona puesto que

interacciona con regiones cercanas al lazo de unión. Los resultados obtenidos mediante esta técnica vienen de nuevo a confirmar que los 33 primeros residuos de GrpE se encuentran interaccionando transitoriamente con DnaK<sub>SBD</sub> al observarse un descenso en la proteólisis de los mismos frente al control. Cuando GrpE<sub>69-197</sub> se encuentra unida a DnaK existe en cambio una proteólisis mayor de DnaK con relación a las otras moléculas de GrpE. Esto pone de manifiesto que al estar ausentes los residuos de GrpE que interaccionan con el lazo de unión de DnaK la enzima tiene accesibilidad para digerirle.

Para los ensayos con el mutante alostérico DnaK<sub>KR151A</sub> lo primero que llama la atención es cómo la ausencia o presencia de cualquiera de los nucleótidos no tiene efecto diferencial sobre la digestión de la chaperona en ausencia de GrpE (**Figura 3.6**). Además el hecho de que apenas haya digestión indica que este mutante probablemente presente una estructura bastante compacta en la que ambos dominios estén suficientemente cerca como para impedir el ataque proteolítico del lazo de unión. Cuando DnaK<sub>R151A</sub> se encuentra unida a GrpE, el patrón de digestión de la chaperona sigue siendo similar excepto en el caso de la unión con GrpE<sub>69-197</sub> que al igual que ocurría cuando interacciona con DnaK silvestre, la chaperona se muestra susceptible al ataque proteolítico en la zona del lazo de unión. Estos dos hechos unidos podrían hacer pensar que efectivamente GrpE provoca un cambio conformacional también a través del SBD de DnaK (puesto que la función alostérica está inhibida) haciendo que la estructura compacta de DnaK mutante regrese a un estado relajado dejando acceso a la papaína (23 kDa) para digerir el lazo de unión.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral han revelado por vez primera la estructura tridimensional completa del complejo aislado de DnaK y GrpE en su conformación nativa. Gracias a esto, ha sido posible localizar la posición de DnaK<sub>SBD</sub> dentro del complejo. Dicho dominio, al igual que DnaK<sub>NBD</sub>, se ha ubicado en el dominio globular de GrpE, en la “cabeza”. Esta disposición, hasta ahora desconocida, es compatible tanto con los resultados bioquímicos publicados como con los presentados en este trabajo. Nuestros resultados corroboran y completan la información de que GrpE no sólo es capaz de actuar como factor de intercambio de nucleótidos, sino que también está implicado en la liberación del sustrato de DnaK al interaccionar directamente con el bolsillo de unión del sustrato situado en DnaK<sub>SBD</sub>. Por ello, hay que destacar la importancia de los residuos amino-terminales de GrpE en el papel de la liberación del sustrato, que han sido visualizados por primera vez, al menos en una fracción de los complejos aislados. Los datos del procesamiento de imágenes de la Microscopía Electrónica desvelan que el “tallo” de GrpE podría ser lo suficientemente flexible como para mostrar diferentes conformaciones. Estas conformaciones oscilarían entre un estado en el que el “tallo”



permanece completamente estirado hasta una conformación más cerrada en la que dicho “tallo” se encuentra en contacto con DnaK<sub>SBD</sub>, forzando la liberación de sustrato.

Con el objeto de seguir profundizando en el conocimiento del mecanismo acción de DnaK, y por extensión del resto de Hsp70s, es necesario resolver muchos interrogantes. El mapa de densidad electrónica obtenido no tiene la suficiente resolución como para establecer en detalle cuáles son los residuos implicados en las interacciones, y probablemente el uso de otras técnicas podrían completar esta información. Entre ellas, el desarrollo de diferentes mutantes puntuales de GrpE y su análisis, por ejemplo, utilizando técnicas de espectroscopía de fluorescencia podrían arrojar luz al problema. Por otro lado, la estructura propuesta puede ser el punto de partida para elaborar nuevas estrategias de aproximación y conseguir resolver la estructura del complejo a una mayor resolución. La información suministrada podría utilizarse en la generación de mutantes de DnaK o GrpE que estabilizaran la unión de manera artificial, pudiendo caracterizar alguna de las conformaciones a alta resolución. A parte de esto, sería interesante determinar de qué manera se encuentra estabilizada la posición de DnaK<sub>SBD</sub> junto a la “cabeza” de GrpE. Dicha posición no implica que tenga que haber un contacto directo con regiones de la “cabeza”, pero la caracterización a alta resolución de la zona podría dar información sobre si existe una interacción o no, y en consecuencia, aportar conocimiento adicional al mecanismo de acción. En resumen, los resultados obtenidos resuelven ciertos interrogantes planteados desde hace tiempo pero abren nuevas incógnitas para la comprensión global del mecanismo de acción de estas chaperonas moleculares.





**Conclusiones**



1. Se ha determinado por primera vez y mediante microscopía electrónica y técnicas de procesamiento de imagen, la estructura tridimensional del complejo formado por la chaperona DnaK y su cofactor GrpE. La estructura obtenida y el ajuste de las estructuras atómicas de los distintos dominios han permitido ajustar de manera unívoca cada uno de los dominios de DnaK y GrpE. Los resultados confirman la unión de DnaK<sub>NBD</sub> al dominio globular de GrpE, pero muestran por primera vez que DnaK<sub>SBD</sub> podría unirse también al mismo dominio, de tal manera que ambos dominios terminarían abrazando a las regiones C-terminales del cofactor.
2. La estructura generada junto con los resultados funcionales obtenidos, permiten sugerir que GrpE, además de actuar como factor de intercambio de nucleótidos, puede estar directamente implicado en la liberación del sustrato. Esta función tendría lugar mediante la interacción de la región N-terminal de GrpE, con DnaK<sub>SBD</sub>, compitiendo con el sustrato por el mismo sitio de unión. Esta interacción se produce debido a la flexibilidad de la región N-terminal, que puede oscilar entre la estructura extendida observada en la estructura cristalográfica, y otra flexionada en la que los aminoácidos de esa región pueden interaccionar con DnaK<sub>SBD</sub> y forzar la liberación del sustrato.



# **Bibliografía**



- Agashe VR, Guha S, Chang H-C, Genevaux P, Hayer-Hartl M, Stemp M, Georgopoulos C, Hartl FU, Barral JM** (2004) Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: Increase in yield at the expense of folding speed. *Cell*, 117: 199–209.
- Albanese V, Yam AYW, Baughman J, Parnot C, Frydman J** (2006) Systems analyses reveal two chaperone networks with distinct functions in eukaryotic cells. *Cell*, 124: 75–88
- Alberti S, Esser C, Höhfeld J** (2003) BAG-1--a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones*. 8(3):225-31
- Amor-Mahjoub M, Gomez-Vrielyunck N, Suppini JP, Fouchaq B, Benarouj N, Ladjimi M.** (2006) Involvement of the interdomain hydrophobic linker and the C-terminal helices in self-association of the molecular chaperone HSC70. *Arch Inst Pasteur Tunis*. 83(1-4):53-62.
- Anfinsen CB** (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230.
- Apetri AC, Horwich AL.** 2008 Chaperonin chamber accelerates protein folding through passive action of preventing aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105:17351–17355.
- Barginear MF, Van Poznak, C, Rosen N, Modi S, Hudis CA, Budman DR** (2008) The heat shock protein 90 chaperone complex: an evolving therapeutic target. *Curr. Cancer Drug Targets.*, 8(6):522-32.
- Ben-Zvi AP & Goloubinoff P** (2001) Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. *Journal of Structural Biology*, 135: 64-93.
- Benaroudj N, Batelier G, Triniolles F, Ladjimi MM.** (1995) Self-association of the molecular chaperone HSC70. *Biochemistry*, 34(46):15282-90.
- Benaroudj N, Fouchaq B, Ladjimi MM.** (1997) The COOH-terminal peptide binding domain is essential for self-association of the molecular chaperone HSC70. *J Biol Chem.*, 272(13):8744-51.
- Benaroudj N, Triniolles F & Ladjimi M** (1996) Effect of nucleotides, peptides, and unfolded proteins on the self-association of the molecular chaperone HSC70. *J. Biol. Chem.*, 271(31):18471-18476.
- Bigotti MG & A Clarke AR** (2008) Chaperonins: The hunt for the Group II mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.* 474: 331-339.
- Bork P, Sander C, Valencia A** (1992) An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7290–7294.

- Braig K** (1998) Chaperonins. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 8: 159-165.
- Brandt F, Etchells SA, Ortiz JO, Elcock AH, Hartl FU, Baumeister W** (2009) The native 3D organization of bacterial polysomes. *Cell* 136(2): 261-271.
- Brehmer D, Gässler C, Rist W, Mayer MP, Bukau B** (2004). Influence of GrpE on DnaK–substrate interactions. *J. Biol. Chem.* 279, 27957–27964.
- Bukau B, Horwich AL.** (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 92:351–366
- Bukau B, Weissman J & Horwich A** (2006) Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell*, 125: 443-451.
- Cabrita LD, Hsu ST, Launay H., Dobson C M & Christodoulou J.** (2009). Probing ribosome-nascent chain complexes produced in vivo by NMR spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106: 22239–22244
- Carrascosa JL, Llorca O & Valpuesta JM** (2001) Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins. *Micron.* 32(1):43-50.
- Chakraborty K, Chatila M, Sinha J, Shi Q, Poschner BC, Sikor M, Jiang G, Lamb DC, Hartl FU, Hayer-Hartl M** (2010) Chaperonin-catalyzed rescue of kinetically trapped states in protein folding. *Cell* 142: 112–122
- Chang HC, Tang YC, Hayer-Hartl M, Hartl, FU** (2007) SnapShot: molecular chaperones, Part I. *Cell*, 128, 212
- Chesnokova LS, Slepnev SV, Protasevich II, Sehorn MG, Brouillette CG, Witt SN** (2003). Deletion of DnaK's lid strengthens binding to the nucleotide exchange factor. GrpE: a kinetic and thermodynamic analysis. *Biochemistry*, 42, 9028–9040.
- Chou CC, Forouhar F, Yeh YH, Shr HL, Wang, C & Hsiao CD** (2003) Crystal structure of the C-terminal 10-kDa subdomain of Hsc70. *J. Biol. Chem.*, 278(32):30311-6.
- Cuéllar J, Martín-Benito J, Scheres SHW, Sousa R, Moro F, López-Viñas E, Gómez-Puertas P, Muga A, Carrascosa JL, & JM Valpuesta** (2008) The structure of CCT-Hsc70NBD suggests a mechanism for Hsp70 delivery of substrates to the chaperonin. *Nat. Struct. & Mol. Biol.*, 15: 858-864.
- Cyr DM, Langer T & Douglas MG** (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci.*, 19(4):176-81.
- Daugaard M, Rohde M & Jäättelä M** (2007) The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*, 581:3702-3710.



- Dobson CM, Sali A & Karplus M** (1998) Protein folding — a perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Edn Engl.* 37, 868–893
- Ecroyd H & Carver JA** (2008) Unraveling the mysteries of protein folding and misfolding. *IUBMB Life.* 60(12):769-74.
- Ellis RJ** (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci.*, 26(10):597-604.
- Ellis RJ** (2006) Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem. Sci.* 31, 395–401.
- Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB** (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346(6285):623-8.
- Frank J** (2002) Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 31:303-19.
- Frydman J** (2001) Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 603–647 (2001).
- Frydman J, Nimmesgern E, Ohtsuka K, Hartl FU** (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370, 111–117
- Garzón JI, Kovacs J, Abagyan R, Chacón P** (2007) ADP\_EM: Fast exhaustive multi-resolution docking for high-throughput coverage. *Bioinformatics*, 23(4):427-433.
- Gassler CS, Wiederkehr T, Brehmer D, Bukau B, Mayer MP** (2001) Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J Biol Chem.* 276(35):32538-44
- Gelinas, A.D., Coth, J., Bethoney, K.A., Langsetmo, K., Stafford W.F. and Harrison, C.J.** (2003) *Biochemistry*, 42, 9050-9059
- Genevaux P, Georgopoulos C, Kelley WL** (2007) The Hsp70 chaperone machines of *Escherichia coli*: a paradigm for the repartition of chaperone functions. *Mol. Microbiol.*, 66(4): 840-857.
- Ghebotareva NA, Kurganov B I, Livanova NB** (2004) Biochemical Effects of Molecular Crowding *Biochemistry*, 69: 1239-1251.
- Goodsell DS** (2009) *Escherichia coli*. *Biochem Mol Biol Educ.* 37(6):325-32.
- Grimshaw JP, Jelesarov I, Schonfeld HJ, Christen P** (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 6098-6104.
- Grimshaw JP, Jelesarov I, Siegenthaler RK, Christen P.** (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 19048-19053.

- Groemping Y, Reinstein J** (2001) Folding properties of the nucleotide exchange factor GrpE from *Thermus thermophilus*: GrpE is a thermosensor that mediates heat shock response. *J. Mol. Biol.* 314: 167-178.
- Groemping Y, Reinstein J** (2001) *J. Mol. Biol.*, 314, 167-178
- Guex N, Peitsch MC** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18:2714-2723.
- Gupta RS, Singh B** (1994) Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Current Biol.* 4: 1104-1114.
- Han W, Christen P** (2001) Mutations in the interdomain linker region of DnaK abolish the chaperone action of the DnaK/DnaJ/GrpE system. *FEBS Lett.* 497, 55-8.
- Harrison C** (2003) GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell Stress & Chaperones*, 8: 218-224.
- Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto, M, Hartl FU, Kuriyan J** (1997) Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science*, 276: 431-435.
- Hartl FU** (1995) Principles of chaperone- mediated protein folding. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 348: 107-112.
- Hartl FU, Bracher A & M Hayer-Hartl** (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis *Nature* 475, 324–332
- Hartl FU, Hayer-Hartl M** (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561):1852-8
- Hartl FU, Hayer-Hartl M** (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature Struct. Mol. Biol.* 16, 574–581
- Haslbeck M** (2002) sHsps and their role in the chaperone network. *Cell Mol Life Sci.*, 59(10):1649-57.
- Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, Hendrix RW, Ellis RJ.** (1988) Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*.333:330–334.
- Hennessy F, Nicoll WS, Zimmermann R, Cheetham ME & Blatch GL** (2005) Not all J domains are created equal: Implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci.*, 14: 1697-1709.

- Heymann JB, Belnap DM** (2007) Bsoft: Image processing and molecular modelling for electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 157(1):3-18.
- Hohfeld J, Cyr DM, Patterson C** (2001) From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* 2: 885–890
- Höhfeld J, Jentsch S** (1997) GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.*, 16(20):6209-16.
- Holm L, Park J** (2000) DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics*, 16:566-567.
- Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW** (2007) Two Families of chaperonin: *Physiology. Annu. Rev. Dev. Biol.*, 23:115-145.
- Hundley HA, Walter W, Bairstow S y Craig EA** (2005) Human Mpp11 J protein: ribosome-tethered molecular chaperones are ubiquitous. *Science* 308(5724):1032-1034.
- Hurley JH** (1996) The sugar kinase heat shock protein 70 actin super family: Implications of conserved structure for mechanism. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 25:137–162.
- Jahn, TR, Radford, SE** (20065) The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.* 272, 5962–5970 (2005)
- Jiang J, Prasad K, Lafer, EM, Sousa R** (2005) Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone. *Mol.Cell.*, 20: 513-524.
- Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, Maier T, Chang HC, Stines AP, Georgopoulos C, Frishman D, Hayer-Hartl M, Mann M, Hartl FU.** Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli. *Cell* 122, 209–220 (2005).
- Kiselev NA, Sherman MB, Tsuprun TL** (1990) Negative staining of proteins. *Electron Microsc. Rev.*, 3(1):43-72.
- Kitamura, A., Kubota, H., Pack, C., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R.I. & K. Nagata** (2006). Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat. Cell Biol.*, 8:1163-70.
- Kleizen B, Braakman I** (2006) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 343–349.
- Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU** (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356, 683–689.

- Laufen T, Mayer MP, Beisel C, Klostermeier D, Reinstein J, Bukau B** (1999) Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ co-chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:5452-5457.
- Levinthal C** (1968) Are there pathways for protein folding? *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 65: 44–45.
- Lin Z, Madan D, Rye, HS** (2008) GroEL stimulates protein folding through forced unfolding. *Nature Struct. Mol. Biol.* 15: 303–311
- Lin Z, Rye HS** (2006) GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 41(4):211-239.
- Lindquist S, Craig EA** (2005) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-77.
- Llorca O** (2005) Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26 (10): 1153-1164.
- Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W**(1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.*, 128(1):82-97.
- Macario, AJL, Conway de Macario E** (2005) Sick chaperones, cellular stress, and disease. *The new England Journal of Medicine*, 353: 1489-1501.
- Marabini R, Masegosa IM, San Martín MC, Marco S, Fernández JJ, de la Fraga LG, Vaquerizo C & Carazo JM** (1996). Xmipp: an image processing package for electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 116 (1): 237-240.
- Martín-Benito J, Gómez-Reino J, Stirling PC, Lundin VF, Gómez-Puertas P, Boskovic J, Chacón P, Fernandez JJ, Berenguer J, Leroux MR, Valpuesta JM** (2007) Divergent substrate-binding mechanisms reveal an evolutionary specialization of eukaryotic prefoldin compared to its archaeal counterpart. *Structure* 15 , 101-110.
- Mayer MP, Rüdiger S, Bukau B** (2000) Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol Chem.* 381(9-10): 877-85
- Mindell, JA, Grigorieff N** (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 142 (3): 334-347.
- Moro F, Fernández V, Muga A** (2003) Interdomain interaction through helices A and B of DnaK peptide binding domain . *FEBS Lett.*, 533: 119-123.
- Moro F, Taneva SG, Velázquez-Campoy A, Muga A** (2007) GrpE N-terminal domain contribuyes to the interaction with DnaK and modulates the dynamics of the chaperone substrate binding domain. *J. Mol. Biol.*, 374:1054-64.

- Muga A, Moro F** (2008) Thermal adaptation of heat shock proteins. *Current Protein and Peptide Science*, 9 (5)
- Multhoff G** (2007) Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. *Methods*, 43: 229–237.
- Nakamoto H, Vigh L** (1997) The small heat shock proteins and their clients. *Cell. Mol. Life Science*, 64: 294-206.
- Nakamura T, Kotani M, Tonozuka T, Ide A, Oguma K, Nishikawa A.** (2009) Crystal structure of the HA3 subcomponent of Clostridium botulinum type C progenitor toxin. *J Mol Biol.* 30;385(4):1193-206..
- Netzer WJ, Hartl FU** (1997). Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* 388, 343–349
- Nowak SJ, Corces VG** (2000). Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active *loci*. *Genes Dev.*, 14: 3003-3013.
- Ohi M, Li Y, Cheng Y, Walz T** (2004) Negative Staining and Image Classification - Powerful Tools in Modern Electron Microscopy. *Biol. Proced. Online.*, 6:23-34.
- Otto H, Conz C, Maier P, Wölflé T, Suzuki CK, Jenő P, Rücknagel P, Stahl J, Rospert S** (2005) The chaperones MPP11 and Hsp70L1 form the mammalian ribosome-associated complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(29): 10064-10069.
- Packschies L, Theyssen H, Buchberger A, Bukau B, Goody, RS, Reinstein J** (1997) GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry*, 36(12): 3417-3422.
- Pascual-Montano A, Donate LE, Valle M, Bárcena M, Pascual-Marqui RD, Carazo JM** (2001) A Novel Neural Network Technique for Analysis and Classification of EM Single-Particle Images. *Journal of Structural Biology*, 133: 233-245.
- Pelham HR.** (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell*. 46:959–961.
- Pellecchia M, Montgomery DL, Stevens SY, Vander Kooi CW, Feng HP, Gierasch LM & Zuiderweg ER.** (2000) Structural insights into substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Nat. Struct. Biol.* 7(4):298-303.
- Popp S, Packschies L, Radzwill N, Vogel KP, Steinhoff H, Reinstein J.** (2005) Structural dynamics of the DnaK-peptide complex. *J. Mol. Biol.*, 347: 1039–1052.
- Prusiner SB.** (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(23):13363-83

- Rist W, Graf C, Bukau B, Mayer MP** (2006) Amide hydrogen exchange reveals conformational changes in hsp70 chaperones important for allosteric regulation. *J Biol Chem.* 281(24):16493-501.
- Ritossa FM.** (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*, 18: 571-573.
- Rüdiger S, Buchberger A, Bukau B** (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol.* 5:342-9
- Saibil HR** (2008) Chaperone machines in action. *Curr. Op. Struct. Biol.* 18:35-42
- Saito H, Uchida H** (1977) Initiation of DNA-replication of bacteriophage-lambda in *Escherichia coli*-K12. *J. Mol. Biol.*, 113: 1-25.
- Saschenbrecker S, Bracher A, Rao KV, Rao BV, Hartl FU, Hayer-Hartl M** (2007) Structure and function of RbcX, an assembly chaperone for hexadecameric rubisco. *Cell* 129, 1189–1200
- Schönfeld HJ, Schmidt D, Schröder, H, Bukau B** (1995) The DnaK chaperone system of *Escherichia coli*: quaternary structures and interactions of the DnaK and GrpE components. *J. Biol. Chem.*, 270(5):2183-2189.
- Schröder H, Langer T, Hartl FU, Bukau B** (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J.*, 12(11):4137-4144.
- Shaikh TR, Gao H, Baxter WT, Asturias FJ, Boisset N, Leith A, Frank J** (2008) SPIDER image processing for single-particle reconstruction of biological macromolecules from electron micrographs. *Nature Protocols*, 3: 1941-1974.
- Sharma S, Chakraborty K, Müller BK, Astola N, Tang YC, Lamb DC, Hayer-Hartl M, Hartl FU** (2008) Monitoring protein conformation along the pathway of chaperonin-assisted folding. *Cell* 133, 142–153
- Shomura Y, Dragovic Z, Chang HC, Tzvetkov N, Young JC, Brodsky JL, Guerriero V, Hartl FU, Bracher A** (2005) Regulation of Hsp70 function by HspBP1: structural analysis reveals an alternate mechanism for Hsp70 nucleotide exchange. *Mol Cell.*, 17(3):367-79.
- Siegers K, Waldmann T, Leroux MR, Grein K, Shevchenko A, Schiebel E, Hartl FU** (1999) Compartmentation of protein folding in vivo: sequestration of non-native polypeptide by the chaperonin-GimC system. *EMBO J.* 18, 75–84
- Skach WR** (2009) Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 606–612

- Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, Hohfeld J, Hartl FU, Moarefi I** (2001) Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*, 291(5508): 1553-7.
- Sousa MC, McKay DB** (1998) The hydroxyl of threonine 13 of the bovine 70-kDa heat shock cognate protein is essential for transducing the ATP-induced conformational change. *Biochemistry*, 37: 15392-15399.
- Sousa R, Lafer EM** (2006) Keep the traffic moving: mechanism of the Hsp70 motor *Traffic.*, 7: 1596-1603.
- Tang YC, Chang HC, Hayer-Hartl M, Hartl FU** (2007). SnapShot: molecular chaperones, Part II. *Cell*, 128, 412.
- Teter SA, Houry WA, Ang D, Tradler T, Rockabrand D, Fischer G, Blum P, Georgopoulos C, Hartl FU** (1999) Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell* 97, 755–765.
- Thulasiraman V, Yang CF, Frydman, J** (1999) In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment. *EMBO J.* 18, 85–95 (1999)
- Trombetta ES, Parodi AJ** (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 649–676
- Tzankov S, Wong MJ, Shi K, Nassif C, Young JC.** (2008) Functional divergence between co-chaperones of Hsc70. *J Biol Chem.*, 283(40):27100-9.
- Uversky VN, Dunker AK.** (2010) Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys. Acta.* 1804:1231–1264
- Uversky VN, Oldfield CJ, Midic U, Xie H, Xue B, Vucetic S, Iakoucheva LM, Obradovic Z, Dunker AK.** (2009) Unfoldomics of human diseases: linking protein intrinsic disorder with diseases. *BMC Genomics*.10:S7
- Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M, Hartl FU** (2010) Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a004390
- Vogel M, Mayer MP, Bukau B.** (2006) Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker. *J Biol Chem.* 281(50):38705-11
- Wandinger SK, Richter K, Buchner J.** (2008) The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283, 18473–18477
- Ward JJ, McGuffin LJ, Bryson K, Buxton BF, Jones, DT.** (2004) The DISOPRED server for the prediction of protein disorder. *Bioinformatics*, 20, 2138-2139



- Worrall LJ, Walkinshaw MD.** (2007) Crystal structure of the C-terminal three-helix bundle subdomain of *C. elegans* Hsp70. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 357(1):105-10.
- Wu C-C, Naveen V, Chien C-H, Chang Y-W, Hsiao C-D** (2012) Crystal structure of DnaK protein complexed with nucleotide exchange factor GrpE in DnaK chaperone system: insight into intermolecular communication. *JBC*. 287(25):21461-70
- Wu, B., Wawrzynow, A., Zylicz, M. and Georgopoulos, C.** (1996) *EMBO J.*, 15, 4806-4816
- Xue B, Williams RW, Oldfield CJ, Dunker AK, Uversky VN.** (2010) Archaic chaos: intrinsically disordered proteins in Archaea. *BMC Syst. Biol.* 4:S1
- Yerbury JJ, Stewart EM, Wyatt AR, Mark R** (2005) Wilson Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO reports* 6: 1131-36
- Young, JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU** (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding. *Nat. Rev. Mol. Cell biol.*, 5(10): 781-791.
- Zhao R, Houry WA** (2007) Molecular interaction network of the Hsp90 chaperone system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 594, 27-36
- Zhou H-X** (2008) Protein folding in confined and crowded environments. *Arch. Biochem. Biophys.*, 469 (1): 76-82.
- Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA** (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272: 1606-1614.
- Zylicz M, Ang, D, Georgopolous C** (1987) The GrpE protein of *Escherichia coli*. *J.Biol. Chem.*, 262: 17437-17442.





